

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-526884
(P2001-526884A)

(43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		35/48	4 B 0 6 5
35/48		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00		C 1 2 N 5/00	E 4 C 0 8 7
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-525525(P2000-525525)
(86) (22) 出願日 平成10年12月18日 (1998. 12. 18)
(85) 翻訳文提出日 平成12年6月19日 (2000. 6. 19)
(86) 国際出願番号 P C T / D E 9 8 / 0 3 8 1 7
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 2 6 0 6
(87) 国際公開日 平成11年7月1日 (1999. 7. 1)
(31) 優先権主張番号 1 9 7 5 6 8 6 4 . 5
(32) 優先日 平成9年12月19日 (1997. 12. 19)
(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 オリヴァー・ブリュストル
ドイツ連邦共和国デー-53340メッケンハ
イム、リンデンヴェーク17番
(72) 発明者 オリヴァー・ブリュストル
ドイツ連邦共和国デー-53340メッケンハ
イム、リンデンヴェーク17番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経前駆細胞、その製造方法および神経性欠陥治療におけるその使用

(57) 【要約】

本発明は、単離され、精製された神経前駆細胞、そのよ
うな前駆細胞を胚幹細胞から無制限量産出させる方法、
ならびにそれらの神経性欠陥、特に哺乳動物、好ましく
はヒトの神経性欠陥の治療およびポリペプチドの産出に
おける使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 神経系に移植された後、非腫瘍形成性である単離された、精製された、胚幹細胞由来の、ニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞。

【請求項2】 (a) E S細胞の増殖、

(b) (a) からのE S細胞の神経前駆細胞への培養、

(c) 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、

(d) (c) からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された該神経前駆細胞の単離、ならびに

(e) (d) からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された、ニューロンおよびグリア特性を有する該前駆細胞の単離によって産出された、胚幹細胞から得られた、初期胚および非神経細胞を15%以下しか含まない、単離され、精製された、非腫瘍形成性の、ニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞。

【請求項3】 (a) で産出された細胞が細胞集合体 (aggregate)、特に胚様体まで増殖している請求項2記載の細胞。

【請求項4】 (a') E S細胞の増殖、

(b') (a') からのE S細胞の神経前駆細胞への培養、

(c') 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、

(d') (c') からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での神経球 (neural sphere) への増殖および精製された該神経球の単離、ならびに

(e') (d') からの神経球の、それらがグリア前駆細胞の単層を生ずるまでの増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された、グリア特性を有する該前駆細胞の単離によって産出された、胚幹細胞から得られた、初期胚および非神経細胞を15%以下しか含まない、単離され、精製された、非腫瘍形成性の、ニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞。

【請求項5】 (a') で産出された細胞が細胞集合体、特に胚様体まで増殖している請求項4記載の細胞。

【請求項6】 単層として生育する請求項1～5いずれか1項記載の細胞。

【請求項7】 神経球として生育する請求項1～5いずれか1項記載の細胞

。

【請求項8】 ニューロン、アストログリアおよび／またはオリゴデンドログリア特性を有する細胞を含む請求項1～5いずれか1項記載の細胞。

【請求項9】 卵母細胞に核移植をした後に得られたES細胞から産出された請求項1～5いずれか1項記載の細胞。

【請求項10】 ES細胞様胚芽細胞から調製された請求項1～5いずれか1項記載の細胞。

【請求項11】 哺乳動物より得られた請求項1～5いずれか1項記載の細胞。

【請求項12】 マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、類人猿およびヒトからなる群から選ばれた種の細胞である請求項11記載の細胞。

【請求項13】 遺伝子的に修飾された細胞である請求項1～10いずれか1項記載の細胞。

【請求項14】 凍結状態である請求項1～13いずれか1項記載の細胞。

【請求項15】 請求項1～14いずれか1項記載の細胞として、自家および非自家細胞を含有する細胞ライブラリー。

【請求項16】 請求項1～5いずれか1項記載の前駆細胞から分化した神経細胞を含有する神経球。

【請求項17】 請求項1～5いずれか1項記載の前駆細胞のin vitro分化を経て得られた請求項16記載の神経球。

【請求項18】 (a) ES細胞の増殖、

(b) (a)からのES細胞の神経前駆細胞への培養、

(c) 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、

(d) (c)からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された該神経前駆細胞の単離、ならびに

(e) (d)からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された、ニューロンおよびグリア特性を有する該前駆細胞の単離の工程を含むことを特徴とする精製された、ニューロンおよびグリア特性を有する

前駆細胞の産出方法。

【請求項19】 (a)における細胞を細胞集合体、特に胚様体に増殖させる請求項18記載の方法。

【請求項20】 (c)における特定培地がbFGFを含有する請求項18または19記載の方法。

【請求項21】 (d)における特定培地がbFGFおよびEGFを含有する請求項18～20いずれか1項記載の方法。

【請求項22】 (e)における特定培地がbFGFおよびPDGFを含有する請求項18～21いずれか1項記載の方法。

【請求項23】 (a') ES細胞の増殖、
(b') (a')からのES細胞の神経前駆細胞への培養、
(c') 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、
(d') (c')からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での、ニューロンおよびグリア特性を有する神経球への増殖および該神経球の単離、ならびに

(e') (d')からの神経球の、それらがグリア前駆細胞の単層を生ずるまでの増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された、グリア特性を有する該前駆細胞の単離の工程を含むことを特徴とするニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞の産出方法。

【請求項24】 (a')での細胞を細胞集合体、特に胚様体に増殖させる請求項23記載の方法。

【請求項25】 (f')工程(e')からのグリア前駆細胞の分化の、アストログリアまたはオリゴデンドログリアとなる方向に向けての操作およびアストログリアまたはオリゴデンドログリア特性を有する前駆細胞の単離工程をさらに含む請求項24記載の方法。

【請求項26】 (c')の特定培地がbFGFを含む請求項23～25いずれか1項記載の方法。

【請求項27】 (d')、(e')および(f')での特定培地がbFGFおよび／またはEGFを含有する請求項23～26いずれか1項記載の方法。

【請求項28】 (f')での特定培地がCNTFまたはT3を含有する請求項25～27いずれか1項記載の方法。

【請求項29】 操作を、細胞分離およびセル・ソーティング技術と組み合わせる請求項18～28いずれか1項記載の方法。

【請求項30】 精製前駆細胞を注射に適した培地に懸濁させる請求項18～29いずれか1項記載の方法。

【請求項31】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、神経系への移植のための使用。

【請求項32】 請求項16または17記載の神経球の、神経系への移植のための使用。

【請求項33】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、神経性欠陥の治療のための使用。

【請求項34】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、神経細胞の再構成のための使用。

【請求項35】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、神経系の脱ミエリン化域の再ミエリン化のための使用。

【請求項36】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、神経系への細胞性 (cell-mediated) 遺伝子導入のための使用。

【請求項37】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞の、ポロペプチドのin vitro産出のための使用。

【請求項38】 請求項1～15いずれか1項記載の前駆細胞を含む神経性欠陥の治療用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、単離され精製された胚性幹細胞由来の神経前駆細胞、無制限な量のかかる前駆細胞の生成、ならびに I) 特に哺乳動物における、好ましくはヒトにおける神経性欠陥の治療、および II) ポリペプチドの生成、のためのそれらの使用に関する。

【0002】

哺乳動物神経系中への神経細胞の移植は、多くの神経学的疾患の治療に対する将来性のある方法である。動物を用いた研究において、種々の細胞集団が脳および脊髄中に移植されている (Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease, Raven Press, New York, 1993中Bjorklund執筆部分; Brustle & McKay, Curr. Opinion Neurobiol. 6: 688-695, 1996)。最近、神経移植が選択された疾病の臨床的治療、例えば、パーキンソン病患者の治療に適用されている (Neural transplantation in Parkinson's disease, Raven Press, New York, 1984中Lindvall執筆部分; Olanow et al., TINS 19: 102-109, 1996)。

【0003】

多くの他の器官とは対照的に、成熟した哺乳動物神経系は非常に限定された再性能しか示さない。このことは、数少ない例外はあるが、神経組織の発生に必要とされる前駆細胞が神経系の発達に限定されているという事実による。前駆細胞の利用可能性は、成熟神経系における欠陥の移植による修復にとり重要不可欠である。よって、神経移植のためのドナー細胞は、胚の脳由来のものが大部分である。例えば、パーキンソン病個体に対する移植に十分量のドナー組織を得るためには7個までの胚に由来する脳組織が必要である。このことは大きな道德上の問題を生じ、多くの患者の治療にかかるアプローチを使用できるかどうかについては疑問がある。

【0004】

最近、移植前の前駆細胞のインビトロでの増殖により、哺乳動物胚性脳細胞の限られた利用可能性に側道をつけるための多くの研究がなされている。2つの主

要な方法が用いられた。1の方法は、腫瘍遺伝子を用いる前駆細胞の不活化である。このアプローチに用いられる遺伝子の大部分は起源的に腫瘍組織から単離されたものである。これらの「腫瘍遺伝子」は細胞ゲノム中に挿入され、連続的に誤制御される増殖を誘発する (Lendahl & McKay, TINS 13: 132-137, 1990)。

【0005】

より最近のうまく制御されるこの方法の変法には温度感受性腫瘍遺伝子が使用される。このアプローチは「許容」温度におけるインビトロでの細胞増殖を可能にする。体温と等しい非許容温度を選択し、遺伝子産物を不安定化させ、移植後の増殖を停止させる (Renfranz et al., Cell 66: 713-729, 1991)。しかしながら、腫瘍遺伝子は移植された細胞中に残存しており、その後の低い活性または再活性化を完全になくすことはできない。より新しい方法は、分子生物学的道具を用いて増殖フェーズの完了後に腫瘍遺伝子を除去することを目的としている (Westerman & Leboulch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8971-8976, 1996)。すべての細胞系と同様に、腫瘍遺伝子-不活化前駆細胞は染色体異常に対して高い感受性を示す。

【0006】

移植前に前駆細胞をインビトロで増殖させるためのもう1つの方法は、成長因子を用いる増殖の刺激である (Cattano & McKay, Nature 347: 762-765, 1990; Reynolds & Weiss, Science 255: 1707-1710, 1992; Richards et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8591-8595, 1992; Ray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3602-3606, 1993; Kilpatrick & Bartlett, Neuron 10: 255-265, 1993; Ray & Gage, J. Neurosci. 6: 3548-3564, 1994; Davis & Temple, Nature 372: 263-266, 1994; Vicario-Abejon et al., Neuron 15: 105-114, 1995; Gosh & Greenberg, Neuron 15: 89-103, 1995; Gritti et al., J. Neurosci. 16: 1091-1100, 1996)。どの程度まで成長因子が神経前駆細胞の増殖を可能にするのかは現在不明である。成長因子で処理した細胞を用いた最初の移植の研究は議論の余地のある結果を示した。幾人かの科学者は、これらの細胞が宿主組織中に取り込まれる能力が低下していることを観察しているが (Svendsen et al., Exp. Neurol. 137: 376-388, 1996)、成長因子で処理された細胞はレシピエント

の脳中に取り込まれうることを示唆する研究がある (Gage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11879-11883, 1995)。

【0007】

要約すれば、宿主神経系中に移植された後の、成長因子により媒介される神経前駆細胞の増殖およびこれらの増殖した細胞の生物学的挙動の増加オーダーは現在不明である。腫瘍遺伝子により媒介される細胞増殖法は、染色体異常および潜在的な腫瘍誘発の危険性が高い。これらの方法の最も重大な欠点は、脳組織の利用可能性に依存しており、その大部分が胚ドナー由来のものであるということである。

【0008】

胚性幹細胞 (ES細胞) は移植用ドナー細胞の生成について全く新しい見通しを有するものである。ES細胞はマウスのものが1981年に初めて記載された (Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7634-7638, 1981; Evans & Kaufman, Nature 292: 154-156, 1981)。それらは、例えば、3.5日目の胚の内部細胞塊由来である。ES細胞は多分化能を有し、すべての組織および細胞タイプを発生させうる。このことは、別の胚盤胞中に注入されたES細胞が、生殖系を包含するすべての組織の発生に関与でき、そのことによりキメラ動物が得られるという事実により、最もよく示されている (Bradley et al., Nature 309: 255-256, 1984)。ES細胞のユニークな特徴は、白血病抑制因子 (LIF) の存在下においてそれらが多分化能のある段階で維持され、増殖できるという事実である (Smith et al., Nature 336: 688-690, 1998)。今日、このことは、ES細胞の遺伝学的修飾に頻繁に利用されている。その後、これらの処理されたES細胞の胚盤胞への注入を用いてトランスジェニック動物が得られている (Robertson et al., Nature 323: 445-448, 1986)。あまり頻繁ではないが、ES細胞はインビトロでの分化の研究に使用されている。この方法は、インビトロにおける制御された条件下での初期組織の発達に関する研究および実験的処理を可能にする。ラット (Iannaconns et al., Dev. Biol. 163: 288-292, 1994)、ハムスター (Doetschman et al., Dev. Biol. 127: 224-227, 1988)、鳥類 (Pain et al., Development 122: 2339-2348, 1996)、魚類 (Sun et al., Mol. Mar. Biol. B

biotechnol. 4: 193-199, 1995)、ブタ (Wheeler, Reprod. Fertil. Dev. 6: 563-568, 1994)、ウシ (First et al., Reprod. Fertil. Dev. 6: 553-562)、ならびに霊長類 (Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844-7848, 1995) を包含する多種多様な種から多分化能胚性幹細胞が単離されている。ドイツ特許出願第197 56 864. 5号の出願から数カ月後に、2つの研究チームが、胚性ヒト組織からのES細胞およびES細胞様幹細胞の単離に成功した (Thompson et al., Science 282: 1145-1147, 1988; Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726-13731, 1998)。他の最近の研究は、胚および成熟哺乳動物細胞由来の核を脱核卵母細胞中に移植することにより胚および胚性細胞を得ることが可能であることを示している (Campbell et al., Nature 380: 64-66, 1996; Wilmut et al., Nature 385: 810-813, 1997)。

【0009】

最近2～3年の間に、いくつかの研究グループがインビトロにおけるES細胞の神経細胞への分化に成功している。多くの場合、凝集したES細胞をレチノイン酸で処理することにより神経分化が開始された (Bain et al., Dev. Biol. 168: 342-357, 1995; Strubing et al., Mech. Dev. 53: 275-287, 1995; Fraichard et al., J. Cell Sci. 108: 3181-3188, 1995; Finley et al., J. Neurosci. 16: 1056-1065, 1996)。このようにして分化した細胞のいくつかはニューロンの特性 (Bain et al., Dev. Biol. 168: 342-357, 1995; Strubing et al., Mech. Dev. 53: 275-287, 1995; Fairchild et al., J. Cell Sci. 108-3181-3188, 1995; Finley et al., J. Neurosci. 16: 1056-1065, 1996) およびグリア細胞の特性 (Fairchild et al., J. Cell Sci. 108-3181-3188, 1995) を示した。レチノイン酸により媒介される神経分化の誘導は2つの大きな欠点を有する。まず第1に、ニューロン分化は細胞の1つのフラグメントのみにおいて起こる。これらの神経細胞の十分な精製はいままでのところ可能ではない。第2に、レチノイン酸はES細胞分化の強力なインデューサーである。レチノイン酸存在下で分化したニューロンおよびグリア細胞は前駆細胞の段階をほとんど通り越して発達しており、分裂終了段階に入っている。それゆえ、それらは細胞豊富化戦略および移植にとっては限られた価値しか有しない。

【0010】

E S細胞から神経前駆細胞を得るための別法が最近報告された(Okabe et al., Mech. Dev. 59: 89-102, 1996)。凝集して胚様体となったE S細胞を無血清培地に撒き、数日間培養する。この期間中に、特に非神経細胞の大量の死が観察される。この段階の終わりに、80%以上の細胞がネストリン(典型的には神経前駆細胞に見出される中間体フィラメント)を発現する(Frederiksen & McKay, J. Neurosci. 8: 1144-1151, 1988; Lendahl et al., Cell 60: 585-595, 1990)。塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の存在下においてこれらの前駆体細胞はさらに増殖して単層培養となることができ、bFGFを添加しなくなるとニューロンおよび星状細胞へと分化する(Okabe et al., Mech. Dev. 59: 89-102, 1996)。しかしながら、bFGF存在下でのこれらの細胞の増殖能は限られており、わずか2～3代の継代後に星状細胞への分化の増加が観察される(Current Protocols in Neuroscience, John Wiley, New York, 1997中Okabe執筆部分)。かかる短い増殖期間の後においても、やはり培養物は多くの未分化胚性細胞ならびに分化した非神経細胞を含んでいる。かかる混入細胞を含む細胞集団は再構築的な移植(reconstructive transplants)には適さない。未分化E S細胞は腫瘍(テトラトカルシノーマ)を生じさせる可能性があり、非神経ドナー細胞は非神経組織を移植物中に生じさせる可能性がある。現在に至るまで、神経系において腫瘍原性のない移植物となるのに必要な純度であり、神経消失により誘発される異常な挙動からの回復を伴うミエリン形成または消失ニューロンの置換のごときインビボでの機能活性を発揮するのに必要とされる純度である、ニューロンのまたはグリア的特性を有するE S細胞由来の細胞を得ることを可能にする方法は知られていない。

【0011】

はっきりと性質のわかっている十分な数の神経前駆体細胞を得ることは、神経移植における重要な問題である。現在、前駆細胞は胚性哺乳動物脳から単離されている。例えば、7個までのヒト胚由来の材料が1人のパーキンソン病患者の移植に必要である。かかる方法は重大な問題に関連しており、かかる方法を用いて多くのパーキンソン病患者を治療することはできない。移植前にE S細胞をイン

ビトロで増殖させるための努力は、いままでのところ、有意な改良にはつながっていない。腫瘍遺伝子により媒介される不死化は、ドナー細胞中に腫瘍遺伝子が導入されるために、かなりの危険性がある。成長因子により媒介される前駆細胞の増殖の規模のオーダーは有効な臨床的応答には十分でない。さらに、増殖した細胞が宿主組織中に取り込まれる能力についても現在不明である。

【0012】

E S細胞は、神経移植のための興味深い代わりのドナー源である。それらの重要な利点は、それらが長時間にわたり未分化の多分化能段階で増殖しうることである (From Egg to Embryo, Cambridge University Press, Cambridge, 1991中S lack執筆部分)。増殖中にそれらは神経組織を包含するすべての組織に分化する能力を維持している。しかしながら、今まで、それらを選択的に神経細胞に分化させることはできなかった。レチノイン酸を用いて神経分化を誘導する試みは、常に、細胞の1フラクションのみを代表する神経細胞との細胞集団混合物を生じさせた (Bain et al., Dev. Biol. 168: 342-357, 1995; Strubing et al., Mech. Dev. 53: 275-287, 1995; Fairchild et al., J. Cell Sci. 108: 3181-3188, 1995; Finley et al., J. Neurosci. 16: 1056-1065, 1996)。さらに、レチノイン酸誘導によるE S細胞由来のニューロンの生成についての報告があるが、レチノイン酸により誘導された神経前駆細胞に関する報告はない。Dinsmoreらによる研究において、かかる混合集団が、キノリン酸により障害を受けたラットの脳中に移植された。キノリン酸は神経毒であり、ニューロンにダメージを与え、破壊する。移植後、移植細胞のいくぶんかはそのニューロンの表現型を維持した。しかしながら、宿主脳の機能的神経支配または消失した脳機能の再構築はこれらの実験においては観察されなかった (Dinsmore et al., Cell Transplant. 5: 131-143, 1996)。Okabeらにより記載された培養法は、I T S F n培地に胚様体を撒くことを特徴とするが、レチノイン酸に依存しない。この方法は、神経前駆細胞マーカーであるネスチンを発現する85%までの細胞を生じさせる (Okabe et al., Mech. Dev. 59: 89-102, 1996)。しかしながら、これらの細胞集団の純度は再構築目的に使用するにはやはり十分でない。例えば、I T S F n培地で培養された、移植E S細胞由来の前駆細胞は原始的な神経上皮構造ならびに軟

骨およびアデノイド組織のごとき非神経組織を形成することが示された。ITSFn中で培養された細胞をbFGF存在下でさらに分化させることが可能である。しかしながら、細胞はその多分化能を急激に失い、2～3第の継代のうちに分化して主として星状細胞となる。この短時間のうちに、神経前駆細胞から非神経細胞を分離することが可能である。この例のもう1つの欠点はオリゴデンドロサイトの有効な生成を欠くことである。例えば、Okabeらは、植物成長因子を添加しないようにして誘導した分化の後に、オリゴデンドログリアへの分化を観察しなかった。甲状腺ホルモンT₃の添加後でさえも、オリゴデンドログリア抗原は細胞の1～2%において検出されたに過ぎなかった(Okabe et al., Mech. Dev. 59: 89-102, 1996)。ニューロンの分化に関する限り、Okabeらにより報告された研究は、チロシンヒドロキシラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはセロトニン(それらは個々のニューロン間のシグナルトランスダクションにとり非常に重要な化合物である)を発現するニューロンの発生に関する証拠を示すものではない。さらに、これらの研究はペリフェリンを発現するニューロンに関する証拠を示すものでもない。典型的には、ペリフェリンは、末梢ニューロンならびに脳幹および脊髄のニューロンにおいて発現される。

【0013】

よって、本発明の目的は、単離され、精製された、非腫瘍原性の、ニューロンのおよびグリア的特性を有するES細胞由来の前駆体細胞、特に、精製されたニューロンおよびグリア細胞、ならびに実質的に無制限な数のこれらの前駆細胞を製造する方法を提供することである。かかる精製前駆細胞は、腫瘍を形成せずに神経系中への移植を可能にし、またインビボにおける機能活性、例えば、神経損失から生じる異常な挙動の改善を伴うミエリン形成または消失ニューロンの置換を可能にし、さらに神経性欠陥の治療の改良を可能にする。これらの目的は、特許請求の範囲、本発明の説明および開示された図面により明らかである。

【0014】

定義

本明細書で使用する以下の用語および略号は、以下に示す意味を有する。

アストログリア(アストロサイト)

神経系のグリア細胞。アストログリア・プロセスは、脳内の液体から血液系を分離する血液脳関門の部分である。この細胞型の他の機能についてはほとんど知られていない。

自家

同じ個体からの（例、同じ個体からの細胞）。

b F G F

塩基性線維芽細胞増殖因子、F G F - 2（線維芽細胞増殖因子2）と同じ。神経前駆細胞の増殖を刺激する増殖因子。

C N T F

毛様体神経栄養因子。

D M E M / F 2

ダルベッコ修正イーグル培地／栄養ミックスF 1 2（1：1）。血清不含培養に使用できる商業的に入手可能な細胞培養培地（例、Life TechnologiesからのNo. 11320）。

E G F

上皮増殖因子。神経前駆細胞の増殖を刺激する増殖因子。

胚様体

懸濁して増殖する細胞集合体。E S細胞を細菌培養皿で増殖させて胚様体を発生させることができる。これらは初期胚と類似性を示し、種々の異なった組織を発生するので、胚様体と称される。

E S細胞

胚幹細胞。これらの細胞は、胚盤胞期の初期胚から単離できる。これらは全ての組織および細胞型を発生できる多分化性細胞を代表する。細胞培養において、これらは、多くの継代にわたって多分化性期に維持できる。E S細胞はまた、核移植、すなわち、細胞核の脱核された卵母細胞への移植およびその後の胚盤胞期への培養によっても得ることができる。E S細胞の定義には、胚芽細胞から得られたE S細胞様細胞も包含する。

【0015】

支持細胞（feeder cells）

他の細胞集団の増殖を支持する細胞集団。例えば、E S細胞は胚線維芽細胞の支持層 (feeder layer) 上でしばしば培養される。

I T S F および N 3 F L

D M E M / F 1 2 培地から由来する細胞培養培地 (Okabe et al., Mech. Dev., 59:89-102, 1996)。

L I F

白血病阻害因子。E S細胞の分化を阻害する因子。

神経前駆細胞

ニューロンやグリア (アストログリアおよびオリゴデンドログリア (オリゴデンドロサイト)) のような成熟神経系細胞に発達する能力を有する神経系の未成熟細胞。

神経球

非被覆細胞培養皿中、増殖因子含有細胞培養培地で神経前駆細胞を増殖させて得られる細胞集合体。

オリゴデンドログリア

神経系のグリア細胞。これらの細胞の最も重要な公知の機能は、神経細胞プロセス (軸索) の遮断である。軸索は、オリゴデンドログリアによって生じるミエリンの鞘により遮断される。ミエリン形成の欠陥は脱ミエリン化疾患をもたらす。最も頻発する脱ミエリン化疾患の一つは多発性硬化症 (M S) である。

P D G F

血小板由来増殖因子。例えば、他の増殖因子との組み合わせで、神経前駆細胞の増殖を刺激できる増殖因子。P D G F - A および P D G F - B サブユニットは、P D F G - A A、P D G F - A B および P D G F - B B として知られる二量体を形成する。

多、複および二性能 (pluri-, multi-およびbipotent) 細胞

多くの異なる (pluri-およびmultipotent) または二つの異なる (bipotent) 成熟細胞型に分化する能力を有する前駆細胞。神経生物学においては、二性能細胞は、しばしば、アストログリアおよびオリゴデンドログリアを発生できる前駆細胞についての用語として使用される。

R T

室温。

【0016】

かくして、本発明は、単離された、非腫瘍形成性の、胚幹細胞由来の、ニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞、好ましくは初期胚および非神経細胞を15%以下しか含まない前駆細胞に関する。好ましい具体例において、細胞は単層または球体として増殖する。特に好ましい具体例において、細胞は、ニューロン、アストログリアおよび／またはオリゴデンドログリア特性を示す。もう一つ別の好ましい具体例において、前駆細胞は、卵母細胞への核移植によって発生した胚盤胞から単離したES細胞から由来する。もう一つ別の好ましい具体例において、前駆細胞は胚芽細胞から発生した胚幹細胞から由来する。もう一つ別の好ましい具体例において、前駆細胞は、哺乳動物ES細胞または哺乳動物卵母細胞から由来する。もう一つ別の好ましい具体例において、前駆細胞は、マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシ、非ヒト類人猿およびヒトから由来する。特に好ましい具体例において、前駆細胞は遺伝子的に修飾されている。もう一つ別の特に好ましい具体例において、前駆細胞は凍結状態で維持される。もう一つ別の特に好ましい具体例において、前駆細胞は、自家および非自家前駆細胞からなる細胞ライブラリーの産出に使用される。

【0017】

本発明は、さらに、

- (a) ES細胞の増殖、
- (b) (a) からのES細胞の神経前駆細胞期への培養、
- (c) 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、
- (d) (c) からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された該神経前駆細胞の単離、
- (e) (d) からの前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された、ニューロンおよびグリア特性を有する該前駆細胞の単離からなる工程を含むことを特徴とする精製された、ニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞の産出方法に関する。

本発明の好ましい具体例において、(a)からのES細胞を集合体、特に胚様体に増殖させる。本発明のもう一つ別の好ましい具体例において、(c)における増殖因子含有、血清不含培地がbFGFを含有する。もう一つ別の好ましい具体例において、(d)および(e)における増殖因子含有、血清不含培地が、各々、bFGF-EGFおよびbFGF-PDGFの増殖因子の組み合わせを含有する。もう一つ別の具体例において、精製神経前駆細胞は、注射に適して培地に導入される。

【0018】

本発明はまた、

- (a') ES細胞の増殖、
- (b') (a')からのES細胞の神経前駆細胞期への培養、
- (c') 増殖因子含有、血清不含培地での該神経前駆細胞の増殖、
- (d') (c')からの神経前駆細胞の、他の増殖因子含有、血清不含培地での神経球への増殖および該神経球の単離、
- (e') (d')からの神経球の、それらがグリア前駆細胞の成長形成を生ずるまでの増殖因子含有、血清不含培地での増殖および精製された該前駆細胞の単離の工程を含むことを特徴とするニューロンおよびグリア特性を有する前駆細胞の産出方法にも関する。

本発明の好ましい具体例において、(a')からのES細胞を細胞集合体、特に胚様体に増殖させる。追加の工程(f')において、(e')で得られたグリア前駆細胞は、培地に単一の因子を加えることにより、アストログリアまたはオリゴデンドログリアへの分化に導かれ、ついで、アストログリアまたはオリゴデンドログリア細胞が単離される。本発明の好ましい具体例において、(c')の増殖因子含有、血清不含培地はbFGFを含む。もう一つ別の好ましい具体例において、(d')、(e')および(f')の増殖因子含有、血清不含培地は増殖因子bFGFおよびEGFのいずれかを、単独で、または組み合わせて含有する。もう一つ別の好ましい具体例において、工程(f')で、毛様体神経栄養因子(CNTF)および甲状腺ホルモン(T3)を使用し、アストログリアおよびオリゴデンドログリアへの分化を促進する。もう一つ別の好ましい具体例におい

て、精製神経前駆細胞は、注射に適した培地に導入される。

【0019】

本発明で得られた神経前駆細胞は、医療処置における治療手段（tool）として使用できる。該神経前駆細胞の好ましい適用は、神経性欠陥の処置のための治療手段の産出である。特に好ましい適用は、神経細胞の再構成または脱ミエリン化神経細胞の再ミエリン化、特に、神経系への細胞移植による脱ミエリン化領域における脱ミエリン化神経細胞の再ミエリン化である。

好ましい適用には、神経系の外傷性、虚血性、退行性、遺伝性、低酸素性、代謝性、感染性、腫瘍形成性または毒性障害に基づく神経細胞の損傷または喪失の再構成が包含される。特に好ましくは、脳および脊髄の外傷性病変、虚血性および出血性梗塞、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、小脳および大脳系の遺伝性萎縮性障害、運動ニューロン病ならびに脊椎筋萎縮における神経細胞の再構成である。好ましい適用には、さらに、年齢に関連した変化による神経細胞の喪失または損傷の再構成が包含される。特に好ましい適用は、神経系の脱ミエリン化領域、とりわけ、多発性硬化症（MS）、アドレノロイコジストロフィーおよびペリツェウスーメルツバッフェル病における脱ミエリン化領域の再ミエリン化である。

ES細胞由来神経前駆細胞のもう一つ別の好ましい適用は、神経系への細胞性（cell-mediated）遺伝子導入である。細胞性遺伝子導入の好ましい適用には、神経系の酵素欠損および腫瘍性疾患による遺伝性代謝障害が包含される。本発明で得られたES細胞由来前駆細胞は、因子、例えば、ポリペプチドの臨床および商業的適用のためのin vitro生産にも使用できる。

【0020】

図面の説明

図1は、ES細胞由来神経前駆体の生成の模式図である。（A）胚線維芽細胞（四角）の支持細胞層上で増殖するES細胞（丸）。増殖後、ES細胞をさらに増殖させてもよく、または液体窒素中で凍結してもよい。（B）支持細胞層なしでゼラチンコートした細胞培養ディッシュ中で増殖するES細胞。（C）神経細胞中の初発分化した胚様体（黒丸）。（D）ITSFn培地中で増殖するプレー

ティングした胚様体。この培地は、神経細胞（黒丸）の生存に有利である。（E）bFGF存在下、増殖因子含有無血清培地（N3FL培地）中で増殖するES細胞由来神経前駆細胞。（F）bFGFおよびEGFの存在下、増殖因子含有無血清培地（N3EFL培地）中で増殖するES細胞由来神経前駆細胞。（G）bFGFおよびPDGFの存在下、増殖因子含有無血清培地（N2FP培地）中で増殖するES細胞由来神経前駆細胞。N2FP培地中での2回の継代の後、細胞を再ミエリン化移植片のために使用してもよい。あるいは、細胞を後の使用のために無血清凍結培地中で凍結してもよい。

【0021】

図2は、ES細胞からの神経球および球由来細胞集団の生成の模式図である。工程（A）～（E）は図1と同じである。（F）bFGFおよびEGFの存在下、増殖因子含有無血清培地（N2EF培地）中で増殖するN3FL培養物から生成した神経球。この段階の細胞を低温保存してもよい。（G）増殖因子停止によって誘導されるES細胞由来神経球のインビトロ分化。球はニューロン、星状細胞およびオリゴデンドロサイトを生じる。（H）ES細胞由来神経球の神経系への移植。（I）プレーティングしたES細胞由来神経球からのグリア前駆細胞の生成（タッチダウン培養物）。ES細胞由来神経球を、増殖因子の存在下で、非コート細胞培養ディッシュに付着し始めるまで増殖させる。この時点で、グリア前駆細胞は球から出て細胞培養ディッシュへ移動する。（K）球の除去後、球由来グリア前駆体をさらに増殖因子の存在下で増殖させる。（I）および（K）において生成した細胞を低温保存することができ、（K）で得たグリア前駆細胞を神経系への移植に使用してもよい。（L）および（M）増殖因子停止の間にCNTFおよびT3を添加することによって、ES細胞由来グリア前駆体の星状細胞（L）およびオリゴデンドロサイト（M）分化が促進される。

【0022】

図3は、ES細胞のインビトロ増殖および分化後の神経前駆細胞の培養物を示す。（A～B）N2FP培地中で増殖するJ1 ES細胞由来の神経前駆細胞の位相差写真。（C～D）bFGFおよびPDGFの停止4日後のN2FP培養物のオリゴデンドロサイト分化。多数の細胞がオリゴデンドロサイトマーカー抗原

04を発現している。対応する免疫蛍光および位相差写真をそれぞれCおよびDに示す。(E~F) N2FP培養物の星状細胞分化。増殖因子の停止4日後に、多数のGFAP陽性星状細胞を検出することができる。対応する免疫蛍光および位相差写真をそれぞれEおよびFに示す。(G~H) N2FP培養物のニューロン分化。オリゴデンドロサイトおよび星状細胞に加えて、ニューロンを増殖因子の停止後に検出することができる。これらは、長い突起およびニューロンマーカー抗原 β -III-tubulinの顕著な発現を示す。対応する免疫蛍光および位相差写真をそれぞれGおよびHに示す。

【0023】

図4。ES細胞由来グリア前駆体の移植後にレシピエント脳から得たビブラーム切片。胎児ラット脳への移植後、グリア前駆細胞はオリゴデンドロサイトおよび星状細胞に分化する。ES細胞由来オリゴデンドロサイトは宿主脳をミエリン化する。(A) 胎児ラット脳への脳室内移植の後、ドナー由来星状細胞は脳組織に移動する。この実験において、N2FP培養物の単一細胞懸濁物を、17日齢ラット胚の脳室系に注射した。レシピエント動物を生後3週目に分析した。マウス特異的グリア抗原M2に対する抗体を使用してドナー由来細胞を検出した。第3脳室が顕微鏡視野の上半分に見える。(B) 新生ラットの大脳皮質におけるES細胞由来グリア細胞の取り込み。細胞を宿主脳室に胚16日目に移植した。マウス特異的抗原M6に対する抗体を使用した免疫蛍光分析。細胞は特徴的なアストログリア形態を示す。(C) 胚17日目にN2FP培養物の脳室内注射を受けた22日齢ミエリン欠損ラットの蓋(下丘)へのES細胞由来オリゴデンドロサイトの取り込み。マウスサテライトDNAに対するDNAプローブを用いるDNAインサイチュハイブリダイゼーションを使用してドナー細胞を同定した(黒色核標識)。取り込まれた細胞は宿主脳のミエリン化を開始している。ミエリン欠損ラットは中枢神経系におけるPLP免疫反応性を欠いているので、PLPに対する抗体を使用してミエリン化を検出することができる(暗突起)。(D) 22日齢レシピエント動物の視床下部への取り込み後のES細胞由来ミエリン化オリゴデンドロサイトの高倍率観察。細胞は核ハイブリダイゼーションシグナルおよびPLP陽性突起を典型的な平行配向で示す。

【0024】

図5。ES細胞由来神経球および球由来細胞集団の培養物。(A) ES細胞株J1由来の5日齢神経球。この段階の球を神経系への移植に使用してもよい。(B) J1 ES細胞由来の2週齢神経球を、神経前駆細胞において代表的に発現される中間フィラメントであるネスチンに対する抗体で染色した。この段階で、神経球は肉眼で見える(免疫蛍光写真)。(C~D) CJ7 ES細胞由来の5日齢神経球を、ポリオルニチンおよびフィブロネクチンをプレーティングした細胞培養ディッシュ中にプレーティングし、増殖因子の非存在下でさらに5日間培養した。球は崩壊し、神経細胞に分化している。(D)は、ニューロン抗原 β -III-tubulin(明シグナル)および神経前駆細胞マーカーネスチン(暗シグナル、矢印)に対する抗体を使用する二重免疫蛍光分析を示す。対応する位相差写真(C)との比較によって、この視野に示される全ての細胞が2つのマーカーの両方を発現していることが示される。(E~F) 増殖因子の非存在下でポリオルニチンおよびフィブロネクチン上でさらに7日間分化させ、ニューロンマーカー微小管結合タンパク質2(MAP2; E)および神経伝達物質GABA(F)に対する抗体で染色した、5日齢ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)の培養物。これらの免疫蛍光顕微鏡写真は、多数のニューロンが神経伝達物質GABAを発現していることを示す。GABA作動性細胞を富化した細胞集団をハンティングトン病患者における神経移植に使用してもよい。(G~H) ニューロンマーカーMAP2(G)および神経伝達物質グルタミン酸(H)に対する抗体で染色した同じ細胞培養実験由来の細胞(GおよびHは免疫蛍光顕微鏡写真である)。多数のニューロンが神経伝達物質グルタミン酸を発現している。(I) 増殖因子の非存在下でポリオルニチンおよびフィブロネクチン上でさらに2週間分化させ、ニューロンマーカー抗原 β -III-tubulin(細胞突起における繊維状染色)およびシナプシン(細胞突起に結合した点状シグナル)に対する抗体で二重標識した、5日齢ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)の培養物。ニューロンの分化を支持するために、細胞をニューロトロフィンである脳由来神経栄養因子(BDNF; 20 ng/ml)でインビトロ分化の最後の5日間に処理した。写真は、ES細胞由来神経球から生成したニューロンが成熟形態を

発達させ、ニューロンシグナリングに重要なシナプスタンパク質を発現していることを示す。(K) 増殖因子の非存在下でポリオルニチンおよびフィブロネクチン上で分化させ、チロシンヒドロキシラーゼに対する抗体で標識した、5日齢ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)の培養物。チロシンヒドロキシラーゼを発現しているニューロンをパーキンソン病患者における移植に使用する。この免疫蛍光分析は、多数のES細胞由来ニューロンがこの酵素を発現していることを示す。(L) 増殖因子の非存在下でポリオルニチンおよびフィブロネクチン上でさらに1週間分化させ、アストログリア抗原であるグリア細胞繊維性酸性タンパク質(GFAP)に対する抗体で標識した、11日齢ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)の培養物。この免疫蛍光分析は、ES細胞由来神経球が星状細胞も生じさせることを示す。(M) 増殖因子の非存在下でポリオルニチンおよびフィブロネクチン上でさらに5日間分化させ、オリゴデンドロサイトマーカーO4に対する抗体で標識した、5日齢ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)の培養物。この免疫蛍光分析は、ES細胞由来神経球がオリゴデンドロサイトも生じさせることを示す。

【0025】

図6。ES細胞由来神経細胞球から生成したグリア前駆細胞。(A) いわゆるタッチダウン培養物の代表例。ES細胞株J1由来の神経球は非コート細胞培養ディッシュに付着し、グリア細胞の外殖を生成する。付着球は振盪によって容易に除去することができ、精製グリア前駆細胞の単層が後に残る。(B) ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)からタッチダウン培養物として生成したグリア前駆細胞集団の免疫蛍光分析。この免疫蛍光分析は、グリア前駆細胞が神経抗原A2B5を発現していることを示す。

【0026】

図7。単一因子の添加による、ES細胞由来グリア前駆体の標的化分化。ES細胞由来神経球(ES細胞株J1由来)から生成し、EGFおよびbFGFの存在下で増殖させたタッチダウン培養物をCNTF(10 ng/ml)またはT3(3 ng/ml)で処理した。2日後、EGFおよびbFGFを停止し、一方、細胞にCNTFまたはT3を与え続けた。増殖因子停止の5日後、細胞を固定し

、星状細胞抗原GFAPおよびオリゴデンドロサイト抗原O4に対する抗体で染色した。対応する免疫蛍光および位相差写真により、CNTFまたはT3の添加がES細胞由来前駆細胞の分化に影響を及ぼすことが示される。CNTFの存在下では、細胞の大部分が星状細胞形態を獲得し、星状細胞マーカーGFAPを発現している。T3の存在下では、細胞は多極性オリゴデンドロサイト形態を獲得し、オリゴデンドロサイトマーカーO4を発現している。

【0027】

図8。インビトロ（A～B）およびハンティングトン病の動物モデルであるイボテン酸傷害ラットの神経系への移植後（C～D）のES細胞由来神経球（ES細胞株J1由来）のニューロン分化。5日齢神経球を成体イボテン酸傷害ラットの線条に移植した。同時に、球のアリコートを増殖因子停止によって5日間にわたってインビトロにおいて分化させ、続いて神経伝達物質GABAに対する抗体で染色した（A、免疫蛍光；b、対応する位相差画像）。図は、多数のES細胞由来ニューロンが神経伝達物質GABAを発現していることを示す。移植の7週間後に、ニューロン分化を示す生存移植片が成体ラット脳に検出される（CおよびD）。（C）マウス特異的神経抗原M6に対する抗体を用いて同定される移植片の低倍率概観（免疫蛍光）。移植片は均質な染色を示し、そしてレシピエント脳に良好に組込まれている。この動物は、イボテン酸傷害によって誘発される回転行動の正常化をともなう機能改善も示した。（D）移植片から隣接宿主脳へ成長したドナー細胞由来軸索。M6に対する抗体での免疫蛍光染色。

【0028】

神経前駆細胞の生成を開始するために、胚幹細胞（例えば、マウス起源の）を、所望の数に、血清含有培地中で、非有糸分裂胚線維芽細胞の支持細胞層上で、標準的な方法（Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press, New York, 1994）に従って増殖させてもよい。J1（Liら、Cell 69:91-926, 1992）、R1（Nagyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8424-8428, 1993）およびCJ7（SwiatekおよびGridley, Genes Dev. 7:2071-2084, 1993）のような樹立マウスES細胞株に加えて、ES細胞を胚（例えば、3～4日齢マウス胚盤胞由来）から得てもよい（Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo, Co

ld Spring Harbor Press, New York, 1994)。ラット (Iannacconeら, Dev. Biol. 163:288-292, 1994)、ハムスター (Doetschmanら, Dev. Biol. 127:224-227, 1988)、鳥類 (Painら, Development 122:2339-2348, 1996)、魚類 (Sunら, Mol. Mar. Biol. Biotechno. 4:193-199, 1995)、ブタ (Wheeler, Reprod. Fertil. Dev. 6:563-568, 1994)、ウシ (Firstら, Reprod. Fertil. Dev. 6:553-562, 1994)、霊長類 (Thomsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848, 1995) のような他の種または胚ヒト組織からES細胞を得てもよい。独国特許出願第197 56 864. 5号の提出の数ヶ月後に、2つの研究チームが胚ヒト組織からのES細胞およびES細胞様幹細胞の単離に成功した (Thomsonら, Science 282: 1145-1147, 1998; Shambloottら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726-13731, 1998)。

【0029】

より最近の研究によって、胚および胚幹細胞を成熟個体の細胞由来の核を脱核した卵母細胞に移植することによって生成することが示されている (Wilmutら, Nature 385:810-813, 1997)。専門家にとっては、そのような核移入ストラテジーと本明細書に記載の発明との組合せによって、同じ個体の分化した細胞からの自己神経前駆細胞の生成が可能となることは明らかである。成熟細胞由来の核の脱核した卵母細胞への移植を介する胚の生成は、ヒツジのような大哺乳動物に適用されており (Wilmutら, Nature 385:810-813, 1997)、それゆえヒトにも適用可能である。ES細胞またはES細胞様細胞を胚生殖細胞から得てもよい。本出願の優先日以降に発行された研究によって、ヒトES細胞をヒト胚盤胞から単離することができること (Thomsonら, Science 282: 1145-1147, 1998)、およびヒトES細胞様細胞をヒト始原生殖細胞から得ることができること (Shambloottら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726-13731, 1998) が示されている。これらの研究は、本出願に記載の方法が、単独でまたは核移植ストラテジーとの組み合わせで、ヒトにも適用可能であることを示す。

【0030】

支持細胞依存性ES細胞株をゼラチンコート細胞培養ディッシュ中にプレーティングし、次いで非コートペトリ皿中でLIFの非存在下で凝集させて、胚様体

を形成させてもよい (Okabeら, Mech. Dev. 59:89-102, 1996)。次いで、3～4日齢胚様体を細胞培養ディッシュ中にプレーティングし、4～8日間無血清培地 (ITSFn培地; Okabeら, Mech. Dev. 59:89-102, 1996) 中で増殖させてもよい。この時期に、顕著な細胞死を非神経細胞に検出することができる。

【0031】

ITSFn培地中での4～8日間の後、小口径ピペットを使用して細胞を単一細胞懸濁物に分離し、N3FL培地に移してもよい。N3FLはbFGFを含有する無血清培地である (Okabeら, Mech. Dev. 59:89-102, 1996)。bFGFを使用して、神経前駆細胞の増殖を促進する。

【0032】

N3FL培地中での4～8日間の後、グリアおよびニューロン前駆細胞集団の生成が開始される。ニューロン前駆体とは対照的に、グリア前駆体は、顕著な増殖能を示す。本明細書に記載の方法は、この増殖能を利用する。N3FL培養物由来の細胞を連続的に異なる無血清増殖因子含有培地で増殖させる。この時期の間、星状細胞およびオリゴデンドロサイト分化能を有する両能性前駆体の強い富化を観察することができる。付随して、始原胚細胞および非神経細胞が分化し、培養物から除かれる。最後に、N3FL培地中で培養した細胞を機械的に収集し、単一細胞懸濁物に分離し、無血清培地 (これは増殖因子bFGFおよびEGFを含有してもよい (N3EFL培地)) に移す。この培地中で、細胞を単層としてサブコンフルエントになるまで増殖させる。約2回の継代の後、この培地中で培養した細胞を移植目的に使用してもよい。さらなる精製のために、さらなる工程を含めてもよい。

【0033】

N3EFL培地中で培養した細胞を機械的に収集し、単一細胞培養物に分離し、増殖因子の第2の組合せ (例えば、bFGFおよびPDGF) を含有する無血清培地中に再プレーティングしてもよい。

【0034】

このプロトコルで得られる細胞を、この培地中でのさらなる継代を介して増殖させてもよい。約2回の継代の後に、培養物は精製された神経前駆細胞からなり

、これを直接または単離後に、例えば再ミエリン化移植片用に使用してもよい。この段階で、それらは二極性または多極性形態を有する細胞の均質な層を形成する。これらを、この段階またはより初期に、前駆細胞特性の損失なしに凍結融解し得る。増殖因子を数日間添加しない場合、増殖因子停止がインビトロにおける分化を誘導する。この場合、免疫組織化学分析によって、神経前駆細胞のマーカー（例えば、ネスチン）に加えてオリゴデンドロサイトのマーカー抗原（例えば、O4）および星状細胞のマーカー抗原（例えば、GFAP）の存在が示される。O4およびGFAP陽性細胞はそれぞれ細胞集団の20～40%および30～70%を占め得る。さらにニューロン抗原を発現している細胞をこれらの培養物中に見出し得る。

【0035】

神経球の形態におけるニューロンおよびグリアの前駆細胞の産生もまた、N3FL培地中で4～8日後に始まる。神経細胞を豊富にするために、N3FL培地中で増殖した細胞を機械的に採取し、破碎して単細胞懸濁液にし、さらにコーティングしていない細胞培養皿内の成長因子bFGFおよびEGFを含んでいてよい無血清培地中で増殖させた。数日間のうちに、当該細胞は、主にネスチン陽性神経前駆細胞からなる細胞凝集体（神経球）を形成する。神経球はさらに懸濁培養物として増殖できる。対照的に、分化神経細胞および非神経細胞は細胞培養皿表面に付着する傾向がある。

小さな球が形成されるとすぐに、それらを培養物から除去し、コーティングしていない新しい培養皿へ移す。数日（5～7日）間のうちに、その球を移植目的に用いることができる。この場合、その球の中の神経前駆体は、宿主脳に神経を分布する成熟神経細胞へと分化する。小さな未分化神経球を液体窒素中で無血清凍結培地中に凍結し、および解凍して、後の時点で分化させることができる。

【0036】

本発明はまた、移植に適切でありうる球組成物中の分化神経細胞にも関する。これらの細胞は、本明細書に記載のニューロンおよびグリアの性質により、ES細胞由来前駆細胞のインビトロ分化を通じて得ることができる。インビトロ分化を誘導するため、成長因子を回収し、未分化神経細胞を含む球を、例えばポリオ

ルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした細胞培養皿に蒔く。これらの条件下で、当該球は、細胞培養皿表面、さらに、ネスチン陽性神経前駆体、産生ニューロン、星状細胞およびオリゴデンドロサイトに付着する。付着ニューロンはさらに分化して、様々なニューロンマーカー、例えばMAP2、 β -III-チューブリン、シナプシン、コリンアセチルトランスフェラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、GABA、グルタミン酸塩、セロトニン、ペリフェリンおよびカルビンジンなどを発現する。分化ニューロンの変異および生存は、ニューロトロフィン、例えばBDNFまたはニューロトロフィン3 (NT-3) などの添加により促進される。

【0037】

成長因子、例えばbFGFおよびEGFなどを含む無血清培地中で、ES細胞由来神経球を数週間懸濁培養物中に維持できる。この段階で、当該球は容易に裸眼で検出可能な大きさに成長する。これらの条件下で、細胞分化レベルの増進が神経球内で観察できる。したがって、分化の進行した段階でさえも、これらの球を用いてES細胞由来ニューロンを移植できる。単層細胞培養における分化ES細胞由来ニューロンを用いる場合は、これらの細胞の採取は常にニューロンの突起の重大な損傷およびニューロン細胞体の破壊を導くので、これは可能ではない。

【0038】

この2年間に、ニューロン細胞集団の分化に影響を与える数多くの因子が同定された。これらの因子は、例えば、神経組織内の分極を導くことができる。例えば、ソニックヘッジホッグ遺伝子産物は神経組織の腹側の表現型を誘導することが示されている (Ericsonら、Cell 81:747-756, 1995)。かかる因子はES細胞から人為的に生じた神経細胞の分化にも影響を与えと考えられる。専門家にとって、かかる因子の適用が特有の表現型でのニューロン細胞およびグリア細胞の産生を可能にすることは自明である。例えば、腹側の中脳の表現型の誘導は、パーキンソン病患者への移植に適切な細胞をもたらす。神経組織の培養断片においては、ソニックヘッジホッグがドーパミン作動性腹側中脳ニューロンを誘導することがすでに示されている (Wangら、Nature Med. 1:1184-1185, 1995)。

【0039】

E S細胞由来神経球からのグリア前駆細胞の産生のために、成長因子を含有する無血清培地中で、当該球を、細胞培養皿のコーティングしていない表面への付着を始めるまで増殖させる。この期間、b F G FおよびE G Fをそれぞれまたは組み合わせて増殖因子として用いることができる。当該球の付着の後、グリア組織は球から培養皿表面上へと移動する（タッチダウン細胞と称される）。この細胞集団の正確な発生は分かっていない。おそらく、当該球内での細胞分化の増加が付着の促進と移動行動を示すグリア前駆体の形成を導くのであろう。タッチダウン細胞を産生する球を、グリア前駆体の産生系として用いることができる。この目的のため、コーティングしていない細胞培養皿内で短期間（＜1日）だけグリア前駆体産生球を培養する。グリア細胞が付着するとすぐに、当該球を機械的に皿からはずし、別の皿へ移す。これにより、成長因子、例えばb F G FおよびE G F（それぞれまたは組み合わせて適用）などの存在下でさらに増殖できる環形単層のグリア前駆体を得られる。

【0040】

この方法で生じた「タッチダウン細胞」は神経抗原A 2 B 5（Eisenbarthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4913-4917, 1979）し、成長因子回収において、星状細胞およびオリゴデンドロサイトへ分化する。免疫組織化学的方法を用い、オリゴデンドロサイト用マーカー抗原（例えば、04）および星状細胞用マーカー抗原（例えば、GFAP）をこれらの分化細胞内に検出できる。未分化タッチダウン神経球を液体窒素中で無血清凍結培地中に、その増殖および分化能を緩めることなく凍結する。この方法で生じたグリア前駆細胞もまた神経系の移植に用いることができる。

E S細胞由来グリア前駆体の分化は、単一の因子の添加によって影響を受けうる。成長因子回収の間および直前のC T N F（毛様体神経栄養因子）の添加は、星状細胞分化を促進する。この段階の間の甲状腺ホルモンT 3の添加は、オリゴデンドロサイトの分化促進の結果を与える。成長因子処理中または処理後の血清含有培地の添加は、これらの培養において星状細胞の数の激しい増加の結果を与える。

【0041】

専門家にとって、凍結神経前駆細胞を解凍後に移植に用いることもできることは自明である。インビトロ分化プロセスの初期段階で凍結した細胞を、標準的な方法で解凍し、さらに二極および多極細胞の均一な集団が得られるまで増殖させ、経過させることができる。

さらに本明細書に記載の方法を、確立している細胞分離細胞選別法と組み合わせることができる。例えば、神経の下位集団を所定の時点で、蛍光表示式細胞分取（FACS）、免疫パンニング、または類似の方法を用いて分離できる。詳細な選別および下位分類は個々の患者の必要性に合わせた代替細胞（遺伝的に修飾した代替細胞を含む）の産生を可能に示す。ES細胞および本明細書に記載のES細胞由来の神経前駆細胞のどちらもその特性を緩めることなく凍結し解凍することができるので、自己由来のセルバンクを含むセルバンクを確立することが可能である。

【0042】

本明細書に記載の方法論は、神経前駆細胞、例えばニューロン細胞、星状細胞およびオリゴデンドロサイトなどの、例えば神経系の損傷の修復に要求される純度および量での産生を可能にする。本明細書に記載の方法論によって産生される細胞は、わずかに初期胚の、または初期胚でない細胞および非神経細胞を含む。本明細書に記載の神経前駆細胞の純度は、前にOkadaらによって記載された約85%（Mech. Dev. 59:89-102, 1996）をはるかに超える。本明細書に記載の方法論は100%までの純度での神経前駆細胞の産生を可能にする。さらに、本明細書に記載する方法論は脳組織に依存することなく多数の神経前駆細胞の産生を可能にする。本明細書に記載の神経前駆細胞は、様々な種、例えばマウス、ラット、ハムスター、鳥、魚、ブタ、畜牛、霊長類またはヒトなどのES細胞から得ることができる。確立されたESセルラインおよび胚由来のES細胞の双方を用いることができる。さらに、ES細胞を増殖卵母細胞から得ることもできる。当該卵母細胞を除核し、例えば分化組織から得られた細胞核と共に移植し、自己由来の卵母細胞およびES細胞の産生を可能にすることができる。ES細胞またはES様細胞を胚芽細胞から得ることもできる。当該ES細胞を標準的な方法で遺伝的に修飾してもよい。例えば、相同組換えによって、欠陥遺伝子を「正常な」遺

伝子と置き換えることができる。さらに、標準的な方法を用いて遺伝子を欠失させてもよい。これらの方法は、マウスにおいて広く用いられており、その結果、到達水準である。

【0043】

E S細胞の速い増殖およびそれらの遺伝的修飾への従順性は、多数の遺伝的に修飾されたニューロンおよびグリア前駆細胞の産生を可能にする。ニューロンおよびグリア前駆細胞の広範囲の移動可能性と組み合わせにより、このことは、神経系の大きな領域が、欠けている因子を代用し、または神経防御もしくは他の適用のためにデザインされたポリペプチドを分泌できる遺伝的修飾前駆細胞とともに存在することを可能にする。細胞の遺伝的修飾によって、移植片拒絶に関与する表面抗原をコードする遺伝子を除去することもできる。かかる戦略は、E S細胞由来前駆細胞の、免疫抑制を必要としない広範な臨床上の適用を可能にする。

本明細書に記載の神経前駆細胞を、神経欠損治療用の治療用医療手段として用いることもできる。本明細書に記載の神経前駆細胞の適用の典型例は、失われた、または機能的に損なわれた神経の移植神経前駆細胞による復元である。

【0044】

失われた神経を置き換え、およびこの損失に関連する神経学的な欠損を改善するために、本明細書に記載の神経球を、例えば浮遊させて4～7日間成育させ、ついでニューロン欠損を示している脳の領域へ移植する。移植6週間後、分化神経が宿主脳に神経を分布させているのが観察できる。宿主脳組織へ広がっているドナー由来軸索は、たとえばドナー特異的神経抗原に対する抗体を用いて検出できる。ニューロンの復元は機能的改善も導く。このことは、移植前後のイボテン酸傷害ラットにおける行動試験で示すことができる。この目的のため、神経毒イボテン酸の定位注入により多数の線条体ニューロンを死滅させる。その結果得られる欠損は、ハンチントン病と類似性を示す。したがって、この実験モデルはこの疾病の動物モデルとして頻繁に用いられる。単側方イボテン酸損傷の後、作用を受けた動物は、特定の薬剤、例えばアンフェタミンによって誘導できる機能的に非対称で定量可能な、異常な回転行動を現す。ニューロン細胞が多い移植組織は、当該回転行動を正常化できる。この正常化が特に当該移植組織内のGABA

作動性ニューロンの数に依存することは明らかである。回転行動の分析によるイボテン酸損傷モデルおよび神経移植の機能的評価は、詳細に記載されている (Bjorklundら、Functional Neural Transplantation, Saiten 157-195、Raven Press, New York、1994)。本明細書に記載のイボテン酸損傷ラット脳への神経球の移植は、イボテン酸損傷によって誘導される異常な回転行動の有意な手術後の改善の結果を与える。例えば、神経細胞のヒト神経系への移植はすでに患者に実施されている (Olanowら、TINS 19:102-109、1996)。

【0045】

神経球または単層培養物のいずれかから得られる、本明細書に記載のグリア前駆細胞を、神経損傷の治療手段として用いることもできる。本明細書に記載のグリア前駆細胞の適用の典型例は、細胞移植による脱髄した脳領域の再有髄化である。本明細書に記載のグリア前駆細胞は著しい移動可能性を示すので、CNSの広い領域を包囲する脱髄疾病の治療に用いることができる。この場合、当該細胞の局所注入は、CNSの広い領域に十分に定着し、再有髄化できる。この方法で治療できる疾病の典型例は、一般的にCNSの異なる領域での脱髄の複数の病巣に関連する原因不明の疾病である多発性硬化症 (MS) である。本明細書に記載の神経前駆体の移植を用いてかかる損傷を再有髄化できる。この場合、神経前駆細胞の著しい移動可能性を利用し、単一または少数の移植部位から、脱髄の多くの領域を標的とし、修復することができる。

【0046】

ミエリン欠損脳領域を有髄化するために、単層培養物またはES細胞由来神経球から得た細胞を、成長因子含有培地で増殖させ、機械的に採取し、破碎して単細胞懸濁液にできる。かかる細胞懸濁液のミエリン欠損脳領域への移植により、典型的には、移植の約3週間後に容易に検出可能なドナー由来星状細胞およびオリゴデンドロサイトが得られる。典型的には、移植細胞は、ミエリン鞘で宿主軸索を覆う。免疫組織化学的方法を用いて、これらのミエリン鞘中にミエリン基礎タンパク質 (MBP) などのミエリンタンパク質およびプロテオリピドタンパク質 (PLP) を検出できる。

本明細書に記載のES細胞由来神経前駆体を、臨床上および商業上の適用のた

めのポリペプチドのインビトロ産生に用いることができる。

以下の例により、本発明をES細胞由来神経前駆体の産生および移植のために使用する方法を説明する。

【0047】

実施例1：

1.1. ES細胞増殖

常法に従って (Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press, New York, 1994)、20%ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies No. 10119) および1,000 U/ml LIF (Life Technologies No. 13275) を含有するDMEM培地 (Life Technologies No. 11965) 中、一層の未分裂マウス胚線維芽細胞の上でES細胞 (J1株; Li et al., Cell 69:915-926, 1992) を増殖させる。この培地は、FBSおよびLIFに加えて、標準濃度の、非必須アミノ酸 (Life Technologies No. 11140; Okabe et al., Mech. Dev. 59:89-102, 1996)、アデノシン (Sigma No. A-4036)、グアノシン (Sigma No. G-6264)、シチジン (Sigma No. C-4654)、ウリジン (Sigma No. U-3003)、チミジン (Sigma No. T-1895) ならびに0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Sigma No. M-7522)、10 mM L-グルタミン (Sigma No. G-5763) および25 mM HEPES (Sigma No. H-0763) を含有している。この段階および後に続く全ての段階の間、細胞を、5% CO₂ 中、37℃で加湿インキュベーター (湿度>85%) にて培養する。

【0048】

1.2. 養育細胞の除去

ES細胞が亜集密度 (subconfluency) に達するとすぐに、それらをPBS中0.04% EDTAで1回洗浄し、次いで、PBS中0.05%トリプシン (Life Technologies No. 35400) および0.04% EDTAを添加して採集した。細胞を、パストツールピペットを介して数回トリチュレートして、単一細胞浮遊液を得る。ES細胞の増殖に用いた含血清培地を同量添加してトリプシンを中和する。室温で5分間、300×gで遠心分離に付した後、細胞をゼラチンコーティングした細胞培養皿 (Sigma No. G-2500) に6 cmの皿1枚あたり細胞約6×10⁶

個の密度でプレーティングし、さらに、段階1.1で用いた培地中で増殖させる。

【0049】

1.3. 胚様体 (embryoid bodies) の発生

細胞が垂集密的になるとすぐに（すなわち、約2～3日後）、PBS中0.05%トリプシンおよび0.04%EDTA（例えば、6cmの皿1枚あたり1.5ml）を添加してそれらをゼラチンから分離する。分離後、DMEM中10%FBS（例えば、6cmの皿1枚あたり6.5ml；この培地は、段階1.2で用いた培地と同等のものであるが、10%FBSを含むだけであり、LIFを含まない）を添加してトリプシンを中和する。次いで、細胞浮遊液を、例えば、コーティングしていないペトリ皿（Nunc No. 240045）8枚にプレーティングし、DMEM/10%FBS（例えば、6cmの皿1枚あたり4ml）中でさらに増殖させる。

【0050】

1.4. 胚様体のプレーティング

3～4日後、該胚様体を50mlの試験管に移し、沈殿により（ $1 \times g$ ；5分）回収する。上清を廃棄し、胚様体を10cmの細胞培養皿にプレーティングする。プレーティングした胚様体は、細胞培養皿の表面の約50%を覆うようにする。典型的には、ペトリ皿4～6枚から回収した胚様体は、10cmの皿1枚にプレーティングするのに十分であろう。胚様体をDMEM/10%FBS（10cmの皿1枚あたり10ml）中で一夜培養する。

【0051】

1.5. ITSFn培地への移動

プレーティングの1日後、細胞培養皿に付着した胚様体をDMEM/F12（ダルベッコ変法イーグル培地/Nutrient Mix F12（1:1）；Life Technologies No. 11320）で3回洗浄する。10cmの皿の各々にITSFn培地10mlを添加する。この培地は、DMEM/F12、 $5 \mu\text{g/ml}$ インスリン（Intergen No. 540101）、 $50 \mu\text{g/ml}$ アポトランスフェリン（Intergen No. 445275）、 30 nM 塩化セレン（Sigma No. S-5261）、 $5 \mu\text{g/ml}$ フィブロネクチ

ン (Life Technologies No. 33010) およびペニシリン/ストレプトマイシン (100 IU/ml / 100 µg/ml ; Life Technologies No. 15140) を含有している。細胞をこの培地中で4~7日間増殖させ、2日ごとに培地交換する。この期間に、非神経細胞の間で大量の細胞死を観察することができる。さらに、神経前駆細胞が出現し、小さな細胞クラスターを形成するであろう。このITSFn培養を確立する方法は、従前に開示されている (Okabe et al., Mech. Dev. 59:89-102, 1996)。

【0052】

1.6. N3FL培地への移動

ITSFn培地中の細胞培養物をPBS中0.05%トリプシンおよび0.04%EDTAを用いて採集する。同量の含血清培地 (DMEM/10%FBS) を添加してトリプシンを中和する。遠心分離 (300×g ; 5分、室温) 後、細胞を、0.1%DNase (Worthington No. 2139) を含有する無カルシウムーおよび無マグネシウムーハンクス緩衝塩溶液 (CMF-HBSS、Life Technologies No. 14180) に再浮遊させる。10cmの皿1枚から得られた細胞ペレットを全容量3mlに再浮遊させる。次いで、該細胞を、火炎処理した (flame-polished) パスツールピペットをその孔の大きさを減少させつつ (例えば、0.8mm、0.5mmおよび0.2mm) 用いて単一細胞浮遊液にトリチュレートする。残りの細胞クラスターを沈殿により (1×g、5分) 回収し、廃棄する。遠心分離 (300×g、5分間、室温) 後、細胞を、DMEM/F12 (1:1 ; Life Technologies No. 11320) 、25 µg/ml インスリン、50 µg/ml ヒト・アポトランスフェリン、20 nM プロゲステロン (Sigma No. P-8783) 、100 µM プトレッシン (Sigma No. P-5780) 、30 nM 塩化セレン、1 µg/ml ラミニン (Life Technologies No. 23017) 、ペニシリン/ストレプトマイシン (100 IU/ml / 100 µg/ml) および10 ng/ml ヒト組換えbFGF (R&D Systems No. 233-FB) 中、ポリオルニチンコーティングした細胞培養皿上に細胞約30,000個/cm²の密度でプレーティングする。この培地は、Okabeら (Okabe et al., Mech. Dev. 59:89-102, 1996) により開示されたN3FL培地と同等のものである。ポリオルニチンでコーティングするために、細胞培養皿を

H₂O中15 μ g/ml ポリオルニチン (Sigma No. P-3655) で少なくとも2時間満たす。該ポリオルニチン溶液を除去し、該培養皿をPBSで3回洗浄する。N3FL培地中での培養の間、毎日、bFGFを最終濃度10 ng/mlになるまで添加する。2日ごとに培地交換する。

【0053】

実施例2：神経前駆細胞の発生

2.1. N3EFL培地への移動

N3FL培地中で4～5日後、セル・スクレーパー (Costar Nr. 3008) を用いて機械的に採集する。削り取る前に細胞をCMF-HBSSで3回（最後の洗浄液は0.1%DNaseを含む）洗浄する。それらを、段階1.6に記載した火炎処理したパスツールピペットを用いて単一細胞浮遊液にトリチュレートする。遠心分離（300×g、5分間、室温）後、10cmの皿1枚から採集した細胞を、N3EFL培地中、ポリオルニチンコーティングした10cmの皿約5枚にプレーティングする。この培地は、DMEM/F12（1：1）、25 μ g/ml インスリン、100 μ g/ml トランスフェリン、20 nMプロゲステロン、100 μ Mプトレッシン、30 nM塩化セレン、1 μ g/ml ラミニン、ペニシリン/ストレプトマイシン（100 IU/ml/100 μ g/ml）、10 ng/ml ヒト組換えbFGFおよび20 ng/ml ヒト組換えEGF (R&D Systems No. 236-EG) を含有している。毎日、bFGFおよびEGFを各々最終濃度10 ng/ml および20 ng/ml になるまで添加する。2回目の培地交換後は、ラミニンの添加は、省略できる。

【0054】

2.2. N2FP培地への移動

細胞が90%集密的になるとすぐに（例えば、1～2週間後）、それらを、トリプシンを用いずにセル・スクレーパーを用いて採集し、火炎処理したパスツールピペットを用いて単一細胞浮遊液にトリチュレートする。遠心分離（300×g、5分間、室温）後、10cmの皿1枚から採集した細胞を、N2FP培地中、ポリオルニチンコーティングした10cmの皿約5枚にプレーティングする。この培地は、DMEM/F12（1：1）、25 μ g/ml インスリン、100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、 20 nM プロゲステロン、 $100\text{ }\mu\text{M}$ プトレッシン、 30 nM 塩化セレン、ペニシリン/ストレプトマイシン ($100\text{ IU}/\text{ml}$ / $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$)、 $10\text{ ng}/\text{ml}$ ヒト組換え bFGF および $10\text{ ng}/\text{ml}$ ヒト組換え PDGF-AA (R&D Systems No. 221-AA) を含有している。毎日、bFGF および PDGF-AA を添加し、2 日ごとに培地交換する。

【0055】

2.3. N2FP 培地での細胞の継代

細胞が亜集密的になるとすぐに、それらを、トリプシンを用いずにセル・スクレーパーを用いて採集し、1 : 5 の比で継代する。通常、単一細胞浮遊液を得るためにさらなるトリチュレーション段階を必要としない。含 bFGF および PDGF 培地中で少なくとも 2 回継代した後、細胞は、ミエリン再形成移植に用いられる前駆体の個体群を表す。別法として、細胞を、トリプシンを用いずにセル・スクレーパーを用いて採集し、後の使用のために無血清凍結培地 (Sigma No. C-6295) 中で凍結保存できる。精製した神経前駆体を単離し、注射に適している培地、例えば、CMF-HBSS (Life Technologies Nr. 14180) に移すことができる。

【0056】

2.4. 神経前駆細胞のインビトロ分化

インビトロ分化のために、神経前駆細胞を、トリプシンを用いずにセル・スクレーパーを用いて採集し、ポリオルニチンコーティングした細胞培養皿にプレーティングして約 50 % の集密度にする。該細胞を、bFGF および PDGF を添加していない段階 2.2 に記載した培地中でさらに 4 ~ 7 日間増殖させる。2 日ごとに培地交換する。培養物を、PBS 中 4 % パラホルムアルデヒド (Sigma No. P-6148) 中で固定し、オリゴデンドログリア抗原 O4 に対する抗体 (Boehringer No. 1518925、希釈 1 : 10) および星状細胞抗原 GFAP に対する抗体 (Chemicon No. AB1980、希釈 1 : 100) を用いて蛍光免疫分析法に付す。分析により、成長因子を用いなくなると 4 日後に、細胞の 32 % までが、O4 の発現を伴って典型的なオリゴデンドログリア構造を示す。同時に、細胞の 49 % までが GFAP を発現する。さらに、これらの培養物は、神経抗原ベクター III-1 チ

ユーブリンに対する抗体 (BAbCO No. MMS-435P-250、希釈 1 : 500) と免疫反応する細胞を含有した。

【0057】

実施例 3 : 神経球 (neural spheres) およびその神経前駆体の発生

3.1. N2EF 培地中での神経球の発生

N3FL 培地 (段階 1.6 を参照) 中で 4~5 日後、細胞を、セル・スクレーパー (Costar Nr. 3008) を用いて機械的に採集する。削り取る前に、細胞を CMF-HBSS で 3 回 (最後の洗浄液は 0.1 % DNase を含む) 洗浄する。それらを、段階 1.6 に記載した火炎処理したパスツールピペットを用いて単一細胞浮遊液にトリチュレートする。遠心分離 ($300 \times g$ 、5 分間、室温) 後、細胞を、N2EF 培地中、細胞 $1,200 \sim 12,000$ 個 / cm^2 の密度で、コーティングしていない細胞培養皿にプレーティングする。この培地は、DMEM / F12 (1 : 1)、 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ インスリン、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ トランスフェリン、 20 nM プロゲステロン、 $100 \mu\text{M}$ プトレッシン、 30 nM 塩化セレン、ペニシリン / ストレプトマイシン ($100 \text{ IU} / \text{ml} / 100 \mu\text{g} / \text{ml}$)、 $20 \text{ ng} / \text{ml}$ ヒト組換え bFGF および $20 \text{ ng} / \text{ml}$ ヒト組換え EGF (R&D Systems No. 236-EG) を含有している。毎日、bFGF および EGF を各々最終濃度 $20 \text{ ng} / \text{ml}$ まで添加し、2 日ごとに培地交換する。培地交換の間に浮遊している球を失わないように、細胞を、室温で 3 分間、 $150 \times g$ で沈殿させる。ペレットを新しい培地に再浮遊させ、新しいコーティングしていない細胞培養皿にプレーティングする。

【0058】

3.2. ES 細胞由来神経球のインビトロ分化

インビトロ分化のために、5 日齢の ES 細胞由来神経球を室温で 3 分間 $150 \times g$ で沈殿させ、ポリオルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした細胞培養皿にプレーティングし、bFGF および EGF を添加していない段階 3.1 に記載した培地中で培養する。ポリオルニチンおよびフィブロネクチンによる二重コーティングは、まず、段階 1.6 に記載したポリオルニチンで該培養皿にコーティングすることにより行われる。次いで、該培養皿を PBS で 3 回洗浄し

、さらに、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ フィブロネクチンを含むPBSで2～12時間インキュベートする。フィブロネクチン溶液を除去した直後に球をプレーティングしてもよい。プレーティングの1日後、神経球は、典型的には、細胞培養皿に付着した。上清を除去した後、付着した球を新しい培地またはCMF-HBSSで3回洗浄する。次いで、該培養物に新しい培地を添加し、次いで、2日ごとに培地交換する。

【0059】

プレーティングの5日後に固定された神経球に対して行った蛍光免疫分析により、神経抗原の以下の発現プロファイルが得られた（標識細胞の平均パーセンテージ \pm SEM）：ネスチン陽性神経前駆細胞： $66\pm 3\%$ （アメリカ合衆国ベセスダのNIH、M. Marvin und R.D.G. McKayからの抗体、希釈1：1,000）；ペクターII-チューブリン陽性ニューロン： $34\pm 3\%$ （BAbCOからの抗体 No. MMS-435P-250、希釈1：500）；GFAP陽性星状細胞： $30\pm 2\%$ （Chemiconからの抗体 No. AB1980、希釈1：100）；オリゴデンドログリア構造を有するO4陽性細胞： $6.2\pm 1.7\%$ （Boehringerからの抗体、No. 1518925、希釈1：10）。

【0060】

さらに、5日間分化したES細胞由来神経球から発生したニューロンは、微小管会合蛋白質2（MAP-2、Sigmaからの抗体、No. M 4403およびNo. M 1406、希釈1：200）および神経伝達物質GABA（Sigmaからの抗体、No. A-2052、希釈1：700）およびグルタメート（Sigmaからの抗体、No. G-6642；希釈1：700）を発現する。ニューロンの60%までがGABA作動性表現型を示した調製物もあった。10日間を超えて成長因子の不在で分化したES細胞由来神経球の蛍光免疫分析は、また、ニューロンがチロシンヒドロキシラーゼ（Eugeneからの抗体、No. TE101、希釈1：200）、コリンアセチルトランスフェラーゼ（Chemiconからの抗体、No. MAB305、希釈1：250）、セロトニン（Eugeneからの抗体、No. NT102、希釈1：200）、シナプシン（アメリカ合衆国カリフォルニア州パサデナのDr. M. B. Kennedyからの抗体、希釈1：1,000）、ペリフェリン（Chemiconからの抗体、No. AB1530、希釈1：1,000）および

カルビンジン (Sigmaからの抗体、No. C-8666、希釈1 : 100) を発現することを示した。球由来ニューロンの分化および生存は、ノイロトロフィン類、脳由来神経栄養因子 (BDNF ; 20 ng/ml ; Pepro Tech Inc. No. 450-02) および/またはノイロトロフィン3 (NT-3 ; Pepro Tech Inc. No. 450-03) の添加により促進させることができた。10日間以上分化したES細胞由来神経球は、また、環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼに対する抗体 (CNPase ; Sigmaからの抗体、No. C-5922、希釈1 : 200) と免疫反応する分化性乏突起膠細胞を含有していた。

【0061】

3.3. ES細胞由来神経球からのグリア前駆体の発生 (「タッチダウン培養」)

グリア前駆細胞を発生させるために、段階3.1に記載した含成長因子培地中で増殖した球を、それらが組織培養皿のコートニングしていない表面に付着し始めるまで保持する。これは、通常、球培養の10~14日目に生じる。環形の外殖を個々の球の周囲から分離するとすぐに、穏やかに攪拌することにより該球を細胞培養皿から分離し、ピペットを用いて培養物から取り出す。これらの分離した球を新しいコートニングしていない細胞培養皿にプレーティングしてグリア前駆細胞の環形コロニーをさらに発生させる。このようにして得られたグリア前駆細胞のコロニーを同含成長因子培地中でさらに増殖させる。80%の集密度に達した後、細胞を、トリプシンを用いずにセル・スクレーパーを用いて採集し、1 : 5の比で再度プレーティングする。蛍光免疫分析により、このようにして発生したグリア前駆細胞が神経抗原A2B5 (Boehringerからの抗体、No. 1300 016、希釈1 : 200) の強い発現を示すことが判明した。それらを、無血清凍結培地 (Sigma No. C-6295) 中、液体窒素で凍結し、その後、さらに、増殖、移植または分化に付することができる。

【0062】

3.4. ES細胞由来グリア前駆体の標的分化

単一因子によるES細胞由来グリア前駆体の標的分化を以下の試験によって立証した：

段階3.3に記載したbFGF (20 ng/ml) およびEGF (20 ng/ml) の存在下で増殖しているグリア前駆体を機械的に採集し、ポリオルニチンコーティングした細胞培養皿に継代し、それらが約50%の集密度に達するまで増殖させた。次いで、以下の条件下でさらに2日間増殖させた：

1. EGFおよびbFGFの存在下で培養を続けた；
2. EGFおよびbFGFの存在下で培養を続けた；
3. 毎日、CNTF (Regeneron, Inc.; 最終濃度10 ng/ml) を添加しつつEGFおよびbFGFの存在下で培養を続けた；
4. 毎日、T3 (Sigma No. T 6397; 最終濃度3 ng/ml) を添加しつつEGFおよびbFGFの存在下で培養を続けた。

【0063】

2日後、bFGFおよびEGFを2群、3群および4群から取り除き、2日ごとに培地交換しつつ、細胞をさらに5～7日間増殖させた。全培養物をPBS中4%のパラホルムアルデヒド (Sigma No. P-6148) にて固定し、オリゴデンドログリアマーカー抗原O4および星状細胞抗原GFAPに対する抗体を用いて蛍光免疫分析に付した。個々の群について以下の発現プロフィールを得た (平均±SEM)。

- | | |
|----------------------------|-------------|
| 1. オリゴデンドログリア構造を有するO4陽性細胞： | < 1 % |
| GFAP陽性細胞： | < 1 % |
| 2. オリゴデンドログリア構造を有するO4陽性細胞： | 8.2 ± 2.6 % |
| GFAP陽性細胞： | 28 ± 6 % |
| 3. オリゴデンドログリア構造を有するO4陽性細胞： | 2.6 ± 1.8 % |
| GFAP陽性細胞： | 78 ± 2.5 % |
| 4. オリゴデンドログリア構造を有するO4陽性細胞： | 17 ± 3.6 % |
| GFAP陽性細胞： | 39 ± 5.7 % |

これらのデータは、CNTFおよびT3を用いて、各々、星状細胞系列およびオリゴデンドログリア系列に向けてES細胞由来グリア前駆体の分化を誘導できることを示している。

【0064】

実施例4：乏突起膠細胞／星状細胞前駆体の移植

4. 1 移植のための細胞懸濁液の世代

E S細胞由来の膠前駆体の髄鞘形成ポテンシャルは、以下の実験によって証明された。

2. 3に記載のように得られたやや集密的な培養体を細胞スクレーパーでトリプシンを使用しないで採集し、300 x gで5分間の遠心分離によって沈殿させ、0.1% DNaseを含有するCMF-HBSS中に再懸濁した。火炎によって仕上げたパスツールピペットを用いて細胞を単一細胞懸濁液にトリチュレートし、血球計においてカウントし、再び遠心分離によって沈殿させ、約50,000-100,000細胞/ μ lの濃度で2 g/Lグルコース (Sigma No. G-7021) を含有するCMF-HBSS中に再懸濁した。該細胞懸濁液を移植実験の完了まで (すなわち、4-6時間) 氷上で維持した。

【0065】

4. 2 胚性ラット脳への脳室内移植

ミエリン欠損ラット (Ian Duncan, Department of Medical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, 2015 Linden Drive West, Madison, Wisconsin 53706, USA) を移植レシピエントとして使用した。胚性移植の主要な利益は、移植拒絶を誘発することなく異種移植が行われることにある。ミエリン欠損レシピエント動物は、ドナー由来のミエリンを容易に検出することができるという利益を提供する。異種移植片パラダイムの利益は、移植された細胞を容易かつ確実に種特異的DNAプローブ (Bruestleら、Neuron 15: 1275-1285, 1995) で同定できることにある。胚性脳への子宮内移植の方法は、よく確立されている (Bruestleら、Neuron 15: 1275-1285, 1995; Bruestleら、Current Protocols in Neuroscience, John Wiley, New York, 1997)。

【0066】

移植のために、妊娠16または17日目に妊娠したラットにケタミン (80 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹膜内注射によって麻酔をかけた。開腹後、ファイバーオプティック光源を用いる徹照下で個々の胚を同定した。記載のように、ドナー細胞を小さいガラスキャピラリー (孔サイズ50-1

00 μ m) 中に充填し、キャピラリーを子宮壁および胚性頭蓋を通過させてレシピエント胚の側脳室中に前進させた (Bruestleら、Current Protocols in Neuroscience, John Wiley, New York, 1997)。2ないし9 μ lの細胞懸濁液(100,000ないし900,000細胞を含有する)を脳室系中に注入した。いくつかのまたは全ての胚の移植後、外科的縫合で腹を閉じ、母動物を自然分娩させた。該動物モデルにおけるミエリン欠損はX関連の劣性障害であるので、約50%の雄の仔が冒される。冒された動物は第3週齢で強い震えを発現し、通常、出生後第4週以内に死亡する。

【0067】

4. 3 移植レシピエントの組織学的分析

ドナー由来のミエリン形成を検出するために、出生後第3または第4週のレシピエント動物に麻酔をかけ、標準的方法にしたがって、経心臓的にPBS中の4%パラホルムアルデヒド (Sigma No. P-6148) を灌流させた。脳を頭蓋から取り出し、同一の固定液中4℃で一晩固定した後、ビブラトーム (vibratome) を用いて50 μ mの切片に切断した。ドナー細胞をマウスサテライトDNAに対するプローブを用いるDNA *in situ*ハイブリダイゼーションによって検出した (Hoerz & Altenburger, Nucl. Acids Res. 9: 683-696, 1981; Bruestleら、Neuron 15: 1275-1285, 1995)。ドナー細胞由来のミエリンをミエリン塩基性タンパク質 (MBP; Boehringer No. 1118099) またはプロテオリピドタンパク質 (PLP; Ian Griffiths, Department of Veterinary Clinical Studies, University of Glasgow, Bearsden, Scotlandから提供された) のようなミエリンタンパク質に対する抗体を用いて視覚化した。続いて、ミエリンタンパク質に対する抗体で標識された切片をマウスサテライトDNAに対するプローブを用いるDNA *in situ*ハイブリダイゼーションに付した (Bruestleら、Neuron 15: 1275-1285, 1995)。該二重標識法により、ドナー細胞由来のミエリンの明確な同定が可能になる。実験は、脳室に移植されたドナー細胞が多種の終脳、間脳および中脳領域に移動することを示した (14匹の分析したレシピエント動物)。ハイブリダイズした細胞は、例えば、皮質、海馬、中隔、線状体、球、嗅覚器 (olfactorius)、視床、視床下部、天蓋、小脳ならびに脳梁、前交連、視索および視

神経に見出された。ドナー細胞の空間占有クラスターは、脳室系への移植後に観察されなかった。35個の移植された胚のうち11匹の雄の仔がミエリン欠損の徴候を示した。これらのうち8匹が成功した脳室内移植を受けた。これら8匹のうち6匹において、ドナー由来のミエリン形成がMBPまたはPLP-抗体とハイブリダイズした細胞の二重標識によって証明された。残る2匹の動物において、取り込まれた細胞の数は、二重標識法によるドナー由来のミエリン形成の確実な評価について非常に少なかった。しかしながら、マウス特異的抗体M2 (Zhouら、J. Comp. Neurol. 292:320-330, 1990) を用いるこれらの動物由来の切片の免疫組織化学的スクリーニングは、また、宿主組織において取り込まれたドナー由来の膠細胞を示した。ドナー由来のミエリン形成は、脳梁、前交連および天蓋の交連線維のような線維路において最も著しかった。さらに、髄鞘形成ドナー細胞は、皮質、中隔、視床、視床下部および天蓋のような灰白質領域において検出された。8匹の移植が成功した動物のうち7匹は、また、取り込まれたES細胞由来の星状細胞を示した。ドナー由来の星状細胞は、マウス特異的抗原M2 (Zhouら、J. Comp. Neurol. 292: 320-330, 1990) およびM6 (Lundら、Neurosci. Lett. 61: 221-226, 1985) に対する抗体を用いる免疫組織化学によって、または膠線維酸性タンパク質 (GFAP; ICN No. 69-110) に対する抗体を用いるマウス特異的DNAプローブでハイブリダイズされた細胞の二重標識によって検出された。

【0068】

実施例5：ES細胞由来の神経球の移植

5. 1 ES細胞由来の神経球のイボテン酸病変ラットへの移植

神経細胞の解剖学および機能的再構成に対する本明細書に記載のES細胞由来の前駆体のポテンシャルを評価するために、5日齢の神経球を3. 1に記載のようにES細胞系統J1から生じさせた。線状体における片側の神経変性を誘導するために予め神経毒素イボテン酸の定位注入に付した成体Sprague-Dawleyラットの線状体に、これらの球を移植した。該病変モデルはよく特徴付けられており、これらの実験に用いられた病変プロトコールは以前に公表されている (Bruestleら、Current Protocols in Neuroscience, Unit 3.10, John W

ilev. new York, 1997)。移植のために、遊離した球を細胞培養皿から取り出し、50mlの試験管に移した。最終濃度0.1%までDNaseを添加後、球を室温にて150xgで5分間沈殿させ、続いて、CMF-HBSS中の2g/Lグルコース (Sigma No. G-7021) を含有する0.5ml試験管に移した。該方法で懸濁された球を移植実験の完了まで(4時間まで)氷上で維持した。レシピエント動物に麻酔をかけ、球を線状体に定位注入した。孔サイズ0.25-0.75mmを有するガラスキャピラリーを注入に用いた。該移植プロトコールはよく特徴付けられており、詳細に公表されている (Bruestleら、Current Protocols in Neuroscience, Unit 3.10, John Wiley, New York, 1997)。全部で6匹のレシピエント動物を実験に用いた。試験管の底に蓄積した球をガラスキャピラリー中に充填した。定位フレーム (Stoelting No. 51600) を用いて、細胞を線状体中に注入した。球は病変線状体内の2 (n=3) または5 (n=3) 箇所の異なる部位にデリバリーされた。以下の定位的座標を注入に用いた。

【0069】

2箇所の移植部位について：

部位1：	歯のホルダー (teeth holder)：	-2.3mm
	前後方向定位：	+0.2mm (ブレグマから)
	中外側方向定位：	3.0mm (矢状縫合から)
	注入の深さ：	5.5mm (硬膜から)
部位2：	歯のホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+0.2mm (ブレグマから)
	中外側方向定位：	3.0mm (矢状縫合から)
	注入の深さ：	4.0mm (硬膜から)

【0070】

5箇所の移植部位について：

部位1：	歯のホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+0.2mm (ブレグマから)
	中外側方向定位：	3.0mm (矢状縫合から)
	注入の深さ：	6.5mm (硬膜から)

部位2：	歯ホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+0.2mm（ブレグマから）
	中外側方向定位：	3.0mm（矢状縫合から）
	注入の深さ：	5.3mm（硬膜から）
部位3：	歯ホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+0.2mm（ブレグマから）
	中外側方向定位：	3.0mm（矢状縫合から）
	注入の深さ：	4.0mm（硬膜から）
部位4：	歯ホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+1.5mm（ブレグマから）
	中外側方向定位：	2.5mm（矢状縫合から）
	注入の深さ：	6.0mm（硬膜から）
部位5：	歯ホルダー：	-2.3mm
	前後方向定位：	+1.5mm（ブレグマから）
	中外側方向定位：	2.5mm（矢状縫合から）
	注入の深さ：	4.5mm（硬膜から）

球懸濁液10 μ lを各部位に移植した。

【0071】

異種移植片の拒絶を防止するために、レシピエント動物を免疫抑制に付した。移植1日前に開始し、レシピエント動物は毎日、シクロスポリン（サンディマン（Sandimmun），サンドズ（Sandoz）；20mg/kg体重）の腹膜内注射を受けた。免疫抑制の間の日和見感染を防止するために、飲料水をテトラサイクリン（アクロマイシン（Achromycin），リダール（Lederle）；最終濃度100mg/L）で補足した。

【0072】

5. 2 移植レシピエントの機能改善の分析

6匹の移植された動物のうち4匹が移植後4週間以上生き延びた。これらの動物におけるアンフェタミン誘発性回転運動の分析により、以下の値を得た（1分あたりの平均回転数）。

【0073】

動物番号200:	移植34日前:	9.7
	移植37日後:	13.9
動物番号201:	移植24日前:	13.5
	移植37日後:	1.3
動物番号204:	移植43日前:	12.7
	移植50日後:	0.5
動物番号205:	移植86日前:	9.0
	移植42日後:	1.0

【0074】

回転運動の評価のために、レシピエント動物はD-アンフェタミン硫酸塩 (Sigma No. A-3278; 5 mg/kg 体重) の腹膜内注射を受けた。注射後5分で開始し、誘発された回転数を90分間にわたって計測した。アンフェタミン誘発性回転運動の評価は、線状体移植の機能分析のための確立された方法であり、大量に公表されている (Bruestleら、Current Protocols in Neuroscience, Unit 3.10, John Wiley, New York, 1997)。データは、4匹の動物のうち3匹が病変に誘発される回転を明らかに減少させることを示す。

【0075】

5. 3 移植レシピエントの組織学的分析

組織学的分析のために、レシピエント動物は移植後5-9週間目に麻酔をかけ、標準的方法にしたがって、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流した。脳を頭蓋から取り出し、同じ固定液中4℃で一晩固定した後、ビブラトームを用いて50 μ mの切片に切断した。ドナー細胞は、マウスサテライトDNAに対するプローブを用いてDNA in situハイブリダイゼーションによって検出された (Hoez & Altenburger, Nucl. Acids Res. 9:683-696, 1981; Bruestleら、Neuron 15: 1275-1285, 1995)。ハイブリダイズしたドナー細胞を運動分析 (5. 2) に付した全4匹の動物の移植部位において検出した。ドナー細胞のいくつかは、移植部位から隣接する宿主脳領域、特に脳梁に移動した。動物番号200において、移植片は拡張した側脳室内に局在した。該動物において

、イボテン酸注入は、側脳室の連続的な拡張を伴う著しい線状体萎縮をもたらした。これらの解剖学的変化のため、移植された細胞は線状体の代わりに脳室にデリバリーされた。移植片の間違った局在性は、該動物において観察された回転分析における機能的発現の欠損を説明する。

【0076】

正のハイブリダイゼーションシグナルに加えて、移植された細胞もまた、マウス特異的神経抗原M6の強い発現を展示した。該抗原の発現は、特に軸索において著しい（Lundら、Neurosci. Lett. 61: 221-226, 1985; M6抗原は、C. Langenaur, Department of Neurobiology, University of Pittsburgh School of Medicine, 818A Scaife Hall, Pittsburgh, Pennsylvania 15261, USAによって提供され、1:10に希釈して使用された）。レシピエント脳において、多くのドナー由来M6陽性軸索が移植片から隣接する宿主脳組織中へ放出することが見出された。これらの観察は、移植ES細胞由来の神経球からもたらされるニューロンが宿主脳を刺激することを示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ES細胞由来神経前駆体の生成の模式図を示す。

【図2】 ES細胞からの神経球および球由来細胞集団の生成の模式図を示す。

【図3】 ES細胞のインビトロ増殖および分化後の神経前駆細胞の培養物を示す。

【図4】 ES細胞由来グリア前駆体の移植後にレシピエント脳から得たピブラトーム切片の様子を示す。

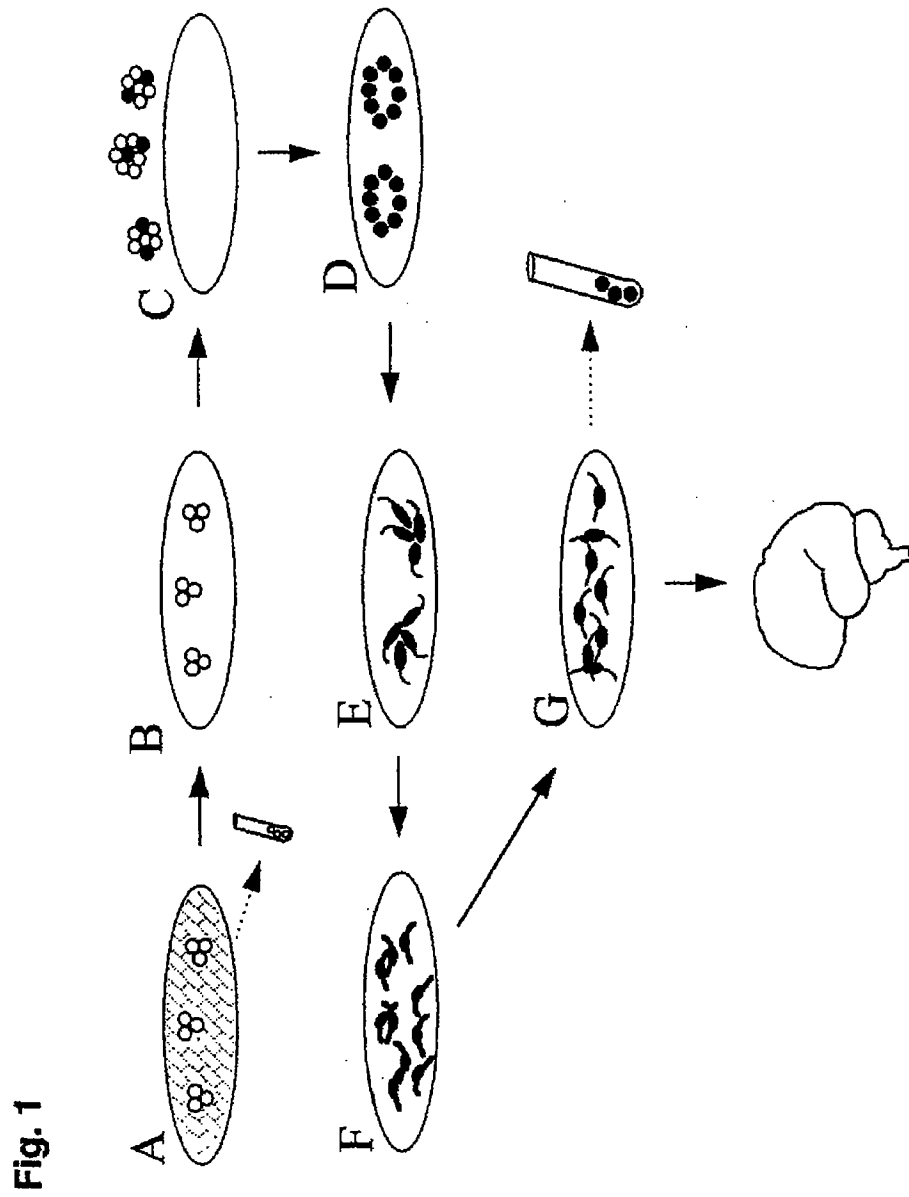
【図5】 ES細胞由来神経球および球由来細胞集団の培養物を示す。

【図6】 ES細胞由来神経細胞球から生成したグリア前駆細胞を示す。

【図7】 単一因子の添加による、ES細胞由来グリア前駆体の標的化分化を示す。

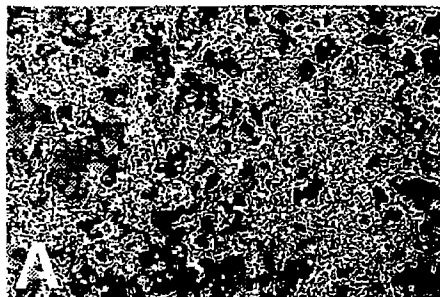
【図8】 インビトロ（A～B）およびハンティングトン病の動物モデルであるイボテン酸傷害ラットの神経系への移植後（C～D）のES細胞由来神経球（ES細胞株J1由来）のニューロン分化を示す。

【図1】

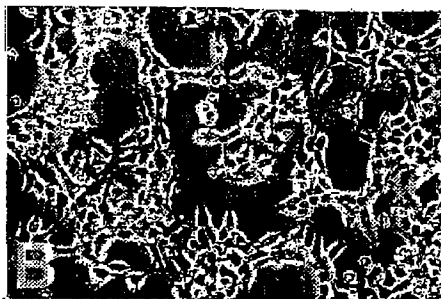


【図3A】

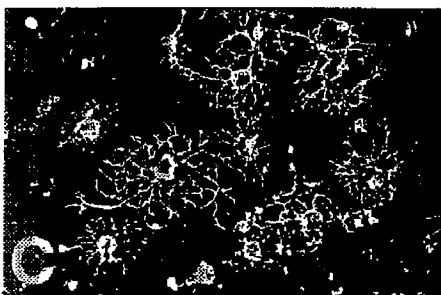
Fig. 3



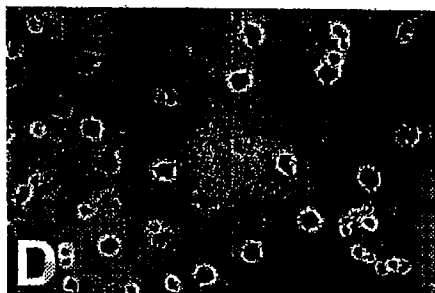
【図3B】



【図3C】



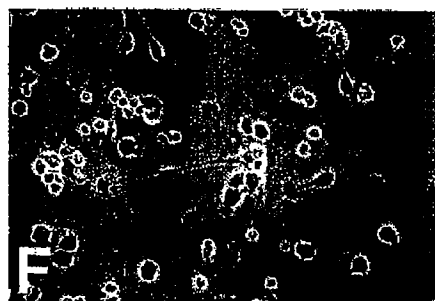
【図3D】



【図3E】



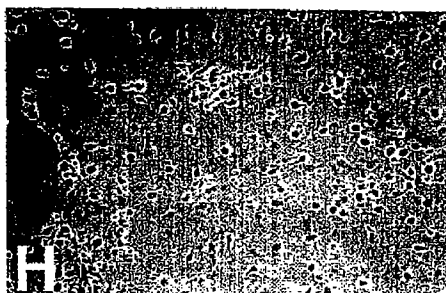
【図3F】



【図3G】



【図3H】

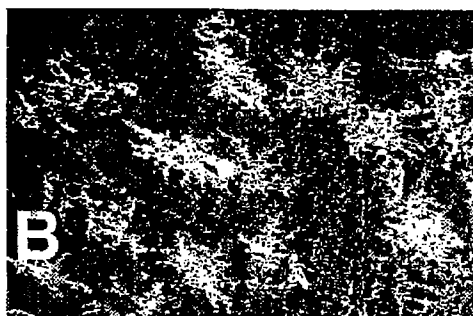


【図4A】

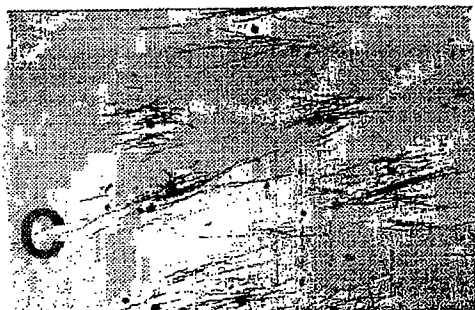
Fig. 4



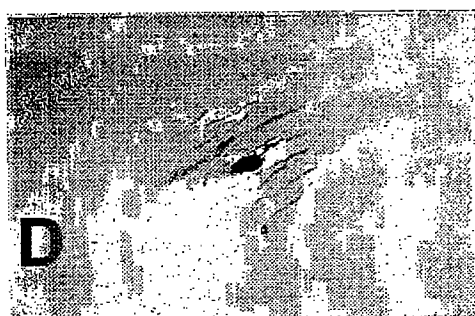
【図4B】



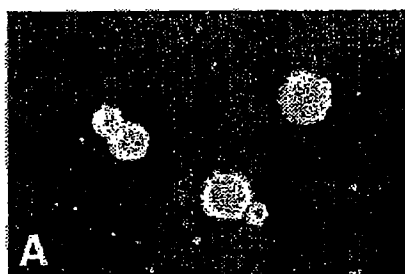
【図 4 C】



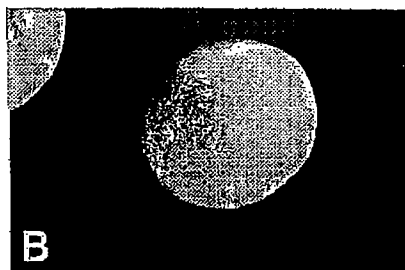
【図 4 D】



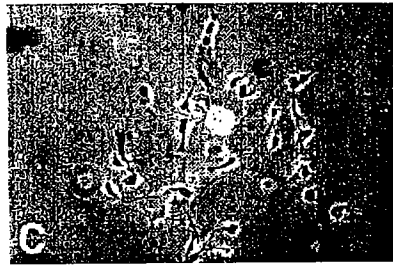
【図 5 A】

Fig. 5

【図 5 B】



【図5C】



【図5D】



【図5E】



【図5F】



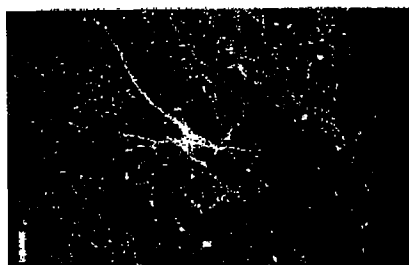
【図5 G】



【図5 H】



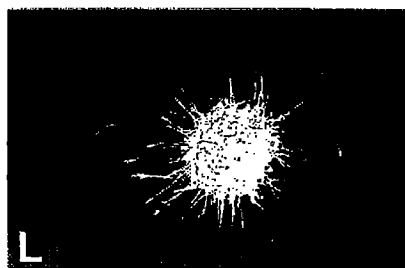
【図5 I】



【図5 K】



【図5L】

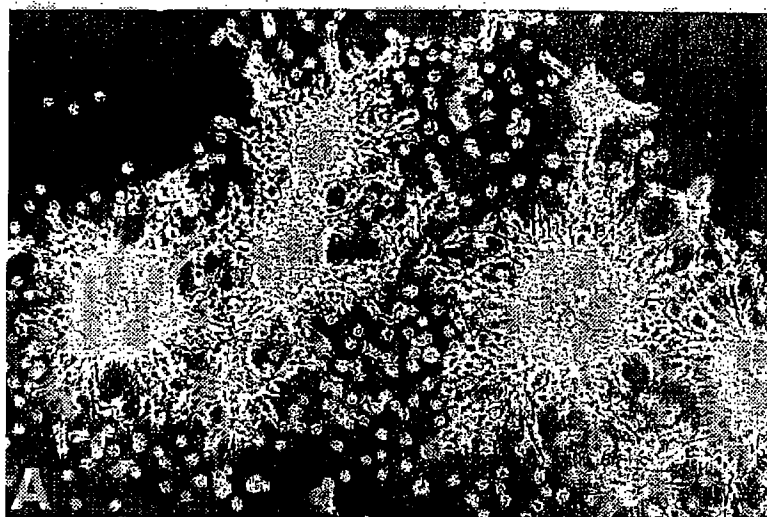


【図5M】

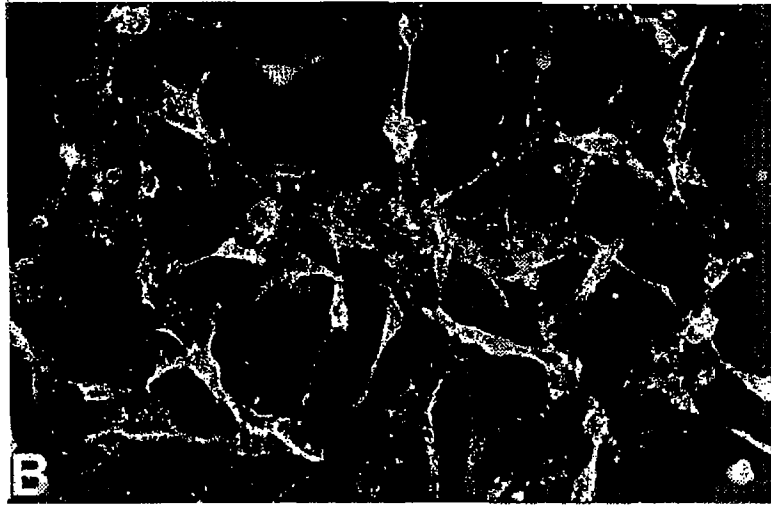


【図6A】

Fig. 6

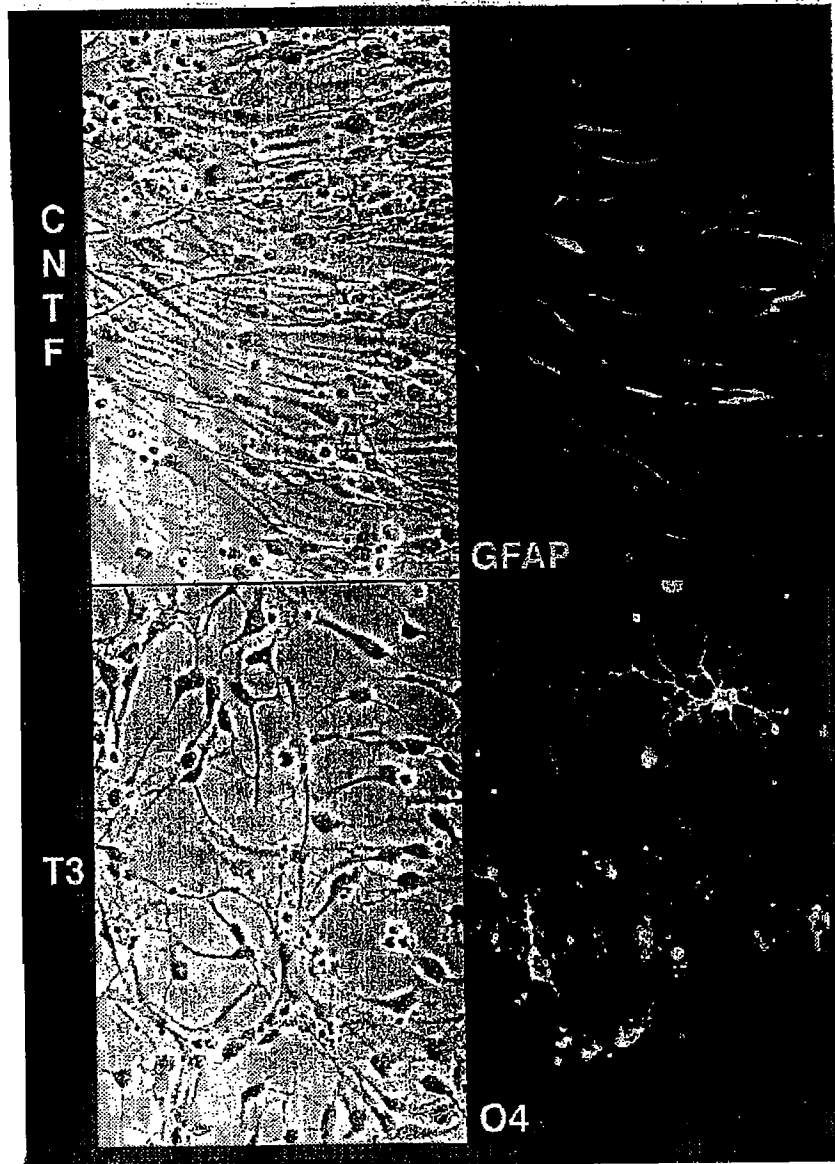


【図6B】



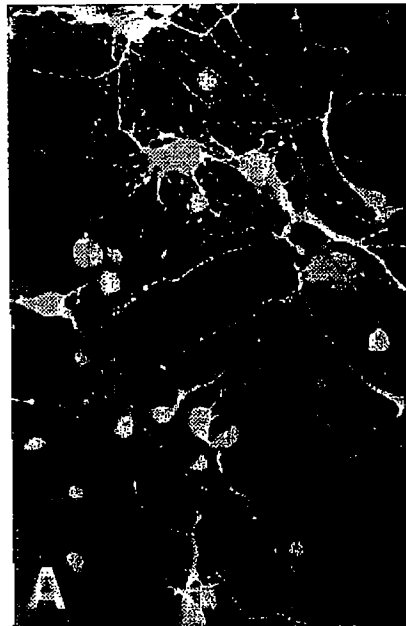
【図7】

Fig. 7

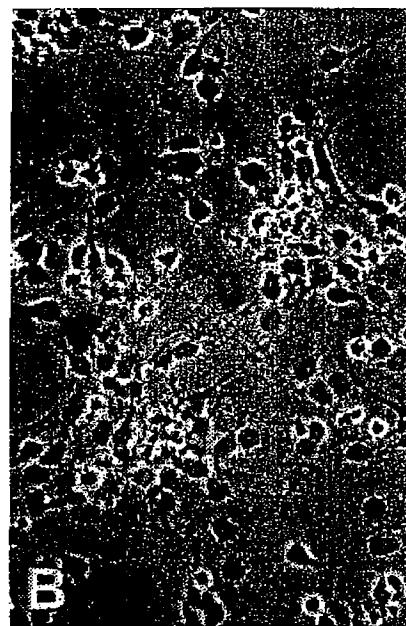


【図8A】

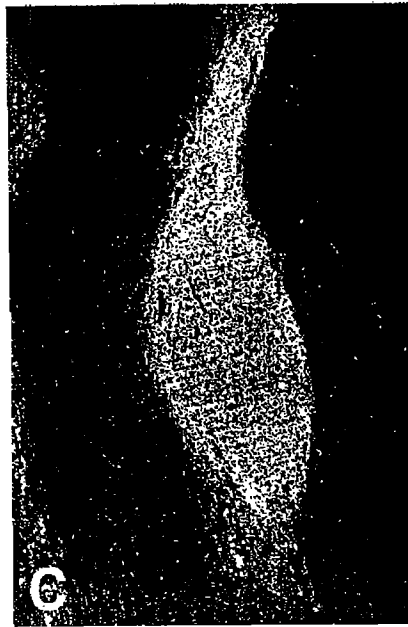
Fig. 8



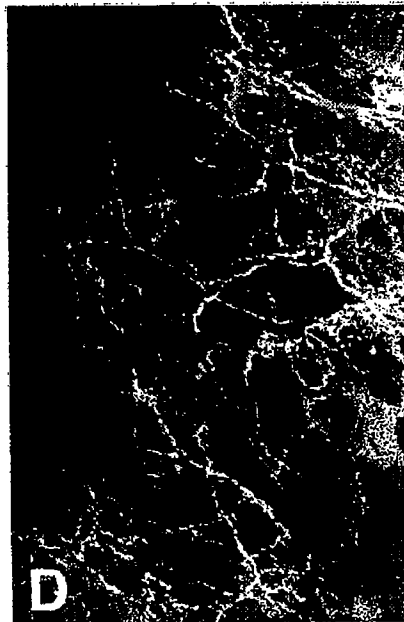
【図8B】



【図8C】



【図8D】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/DE 98/03817	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N5/08 C12N5/10 A61K35/30 A61K48/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
X	WO 97 02049 A (EMORY UNIVERSITY) 23 January 1997 see the whole document
A	WO 97 16534 A (GENENTECH) 9 May 1997 see the whole document
A	WO 95 12665 A (DIACRIN, INC.) 11 May 1995 see the whole document
A	OKABE S ET AL: "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, (1996 SEP) 59 (1) 89-102, XP002105103 cited in the application see the whole document
-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"B" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 June 1999	21/06/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5010 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Moreau, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/03817

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BRUSTLE O ET AL: "In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 DEC 23) 94 (26) 14809-14, XP002105104 see the whole document -----	1,18,23, 31-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/03817

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation: Although Claims Nos. 31-36 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 98/03817

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9702049 A	23-01-1997	US 5753505 A	19-05-1998
		AU 6452196 A	05-02-1997
		CA 2226417 A	23-01-1997
		EP 0841950 A	20-05-1998
WO 9716534 A	09-05-1997	AU 704976 B	13-05-1999
		AU 7663496 A	22-05-1997
		CA 2234230 A	09-05-1997
		EP 0858502 A	19-08-1998
WO 9512665 A	11-05-1995	EP 0725817 A	14-08-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	タームコード (参考)
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, E E, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, L U, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, U G, US, UZ, VN, YU, ZW			
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 DA02 DA03 GA11 GA18 GA23 GA27 4B065 AA90X AA91X AA93X AC20 BA06 BB32 BB34 BD09 CA44 4C084 AA13 MA01 NA14 ZA012 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 4C087 AA01 AA02 BB57 BB65 CA04 MA01 NA14 ZA01			